

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



* 5 3 0 9 5 6 1 5 1 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
DE GENES EXPRESADOS DURANTE
LA GAMETOGENESIS EN RATON.**

TESIS DOCTORAL

DULCE M^a LOPEZ ALAÑON

Madrid, 1993

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
DE GENES EXPRESADOS DURANTE
LA GAMETOGENESIS EN RATON.**

MEMORIA

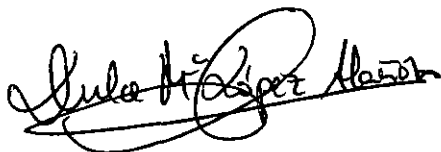
que para optar al grado de

Doctor en Ciencias Químicas

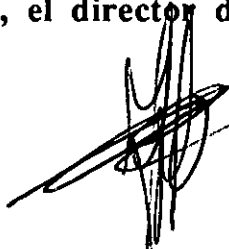
presenta:

DULCE M^a LOPEZ ALAÑON

El autor:



V^oB^o, el director del trabajo:



Dr. Jesús del Mazo

Madrid, 1993

In memoriam, a mis abuelos.

A mis padres y hermanos.

A mi tía.

"En un lugar de La Mancha, de cuyo nombre no quiero acordarme, no ha mucho tiempo que vivía un hidalgo de los de lanza en astillero, adarga antigua, rocín flaco y galgo corredor. . .

Es pues, de saber, que este sobredicho hidalgo, los ratos que estaba ocioso - que eran los más del año -, se daba a leer libros de caballerías con tanta afición y gusto, que olvidó casi de todo punto el ejercicio de la caza, y aún la administración de su hacienda. . .

En resolución, él se enfrascó tanto en su lectura, que se le pasaban las noches leyendo de claro en claro, y los días de turbio en turbio; y así, del poco dormir y del mucho leer se le secó el cerebro, de manera que vino a perder el juicio. Llenósele la fantasía de todo aquello que leía en los libros, así de encantamientos como de pendencias, batallas, desafíos, heridas, requiebros, amores, tormentas y disparates imposibles; y asentósele de tal modo en la imaginación que era verdad toda aquella máquina de aquellas soñadas invenciones que leía, que para él no había otra historia más cierta en el mundo. . ."

"El ingenioso hidalgo Don Quijote de La Mancha"
(Miguel de Cervantes Saavedra)

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) bajo la dirección del Dr. Jesús del Mazo con quien tuve la oportunidad de embarcar en la aventura de la búsqueda de nuevos genes y a quien expreso mi más sincero agradecimiento por convencerme de que merecía la pena intentarlo.

También quiero agradecer al Dr. Alvaro Martínez del Pozo el haber aceptado ser mi tutor en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Complutense de Madrid.

A la Dra. D.B. Krimer, por su colaboración en los experimentos con el gen de la histona H3.3.

Al Dr. Lucas Sánchez, por su permanente estímulo y por sus inconmesurables lecciones de sencillez y naturalidad.

A Luis Andrés, que supo compartir el tiempo y el espacio conmigo.

A Begoña, que me enseñó a dar los primeros pasos por el C.I.B. y a todos los compañeros que, de una u otra forma, han hecho más agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis padres, abuelos y todos mis antepasados, ya que sin todo su aporte genético habría sido imposible la realización de este trabajo.

A M^a Reyes, Javi, Ana, Laura y a mis amigos, que me han aconsejado en todo momento y han estado siempre ahí cuando los he necesitado.

A todas aquellas personas que no saben lo que significan las palabras "quinasa", "ubiquitina", "DNA", "oncogén"... pero sí saben lo que significa la "vida".

ABREVIATURAS

Amp: ampicilina
AMV-RT: transcriptasa reversa del virus de mieloblastosis de aves.
ATP: adenosina-5'-trifosfato
(α - ^{35}S)-dATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato marcada en α con ^{35}S
BSA: albúmina de suero bovino
cDNA: DNA complementario al RNA
col.: colaboradores
cpm: cuentas por minuto
d: días
dATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP: desoxicitidina-5'-trifosfato
(α - ^{32}P)-dCTP: desoxicitidina-5'-trifosfato marcada en α con ^{32}P
DEPC: dietilpirocarbonato
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNapol: DNA polimerasa
DNasa: desoxirribonucleasa
dNTP: desoxinucleósido-5'-trifosfato
DTT: ditioneitol
EDTA: sal disódica del ácido etilén-diamino-tetraacético
Fig.: figura
g.: aceleración de la gravedad
h: hora
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb: 10^3 bases o pares de bases
KDa: kilodalton
M-MuLV-RT: transcriptasa reversa del virus Moloney de leucemia murino.
min: minutos
MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico
mRNA: RNA mensajero
O.D.: densidad óptica
p.c.: post coitum
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la DNA polimerasa
pfu: unidades formadoras de placa o colonia
p.n.: post natal
poli(A) $^{+}$ -RNA: RNA poliadenilado en el extremo 3'
(p/v): relación peso/volumen
PVP: polivinilpirrolidona
RNA: ácido ribonucleico
RNapol: RNA polimerasa
RNasa: ribonucleasa
rRNA: RNA ribosómico
s: segundos
SDS: dodecilsulfato sódico
ssDNA: DNA de cadena sencilla
Tc: tetraciclina
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamina
TFA: ácido trifluoroacético
Tris: trihidroximetil-aminometano
u.: unidades
(v/v): relación volumen/volumen
X-Gal: 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE

INTRODUCCION	1
-Interacción entre las células germinales y las células somáticas	1 1
-Expresión temporal de genes reguladores durante la gametogénesis	1 5
OBJETIVOS	2 1
MATERIALES Y METODOS	2 3
MATERIALES	2 4
-Reactivos	2 4
-Soluciones y Tampones	2 4
-Medios de cultivo	2 6
-Estirpes	2 7
-Enzimas	2 7
-Membranas y Filtros	2 7
-Precursores radiactivos	2 8
-Fotografía y Autorradiografía	2 8
-Productos suministrados conjuntamente para aplicaciones concretas (kits)	2 8
METODOS	3 0
-Tratamiento del material en contacto con RNA	3 0
-Extracción de tejidos	3 0
-Preparaciones citológicas	3 1
-Extracción de RNA total a partir de los tejidos	3 2
-Minigeles de agarosa para RNA y DNA	3 3
-Aislamiento de poli(A) ⁺ -RNA a partir de RNA total	3 3
-Construcción de las genotecas de cDNA	3 5
-Amplificación de las genotecas de cDNA	3 9

-Titulación de las genotecas de cDNA	40
-Gel de poliacrilamida para cDNA	40
-Marcaje de DNA para construcción de sondas	41
-Hibridación de fagos con sondas de DNA	42
-Valoración de la calidad y representatividad de transcritos en las genotecas	43
-Síntesis de sscDNA para el análisis diferencial	43
-Mantenimiento de los fagos	44
-Síntesis de oligonucleótidos	45
-Amplificación por PCR de los insertos de cDNA de una genoteca	46
-Transferencia de DNA a filtros (Southern-Blot)	46
-Excisión del pBluescript a partir del vector λ -ZAP	47
-Purificación de DNA de plásmidos	48
-Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa	48
-Secuenciación de DNA	49
-Geles desnaturalizantes de acrilamida-6.5% para productos de secuenciación	50
-Análisis comparativo de secuencias	50
-Transferencia de RNA a filtros (Northern-Blots)	51
-Hibridación de filtros con sondas marcadas	51
RESULTADOS	53
-Acumulación de tejidos y extracción de RNA total	54
-Construcción de las genotecas de cDNA en λ -ZAP	54
-Análisis diferencial de la genoteca de ovario fetal de 16d	60
-Caracterización de los clones seleccionados	72
- Excisión in vivo del pBluescript a partir de λ -ZAP	72
- Secuenciación de los clones DLA	73

- Comparación de las secuencias DLA con las del banco de datos EMBL	80
-Expresión diferencial durante el desarrollo	83
DISCUSION	108
-Genes de secuencia conocida	111
- Ubiquitina	111
- α 2-colágeno VI	115
- Laminina B2	118
- Piruvato Quinasa-M	121
- Na,K-ATPasa (α 1)	122
- <i>surf-3</i>	125
- α -Globina	128
- IGF-II	131
- Genoma Mitocondrial de Ratón	136
- <i>c-jun</i>	139
- Histona H3.3	142
-Poliadenilación de mRNAs	148
-Clones DLA noveles	152
CONCLUSIONES	156
BIBLIOGRAFIA	159

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La gametogénesis constituye el proceso de diferenciación de las células germinales, en el que las células diploides del ovario (oogénesis) o del testículo (espermatogénesis) se transforman en células haploides (óvulo y espermatozoide) (Migeon y col., 1988, Speed, 1982), conservándose así el estado diploide en el cigoto, tras la fertilización.

En su desarrollo, se han observado una serie de cambios morfológicos bien caracterizados que son producto de un proceso de desarrollo sucesivo que integra la meiosis. Los cambios en los componentes proteicos asociados a esos cambios morfológicos se reflejan por la expresión temporal de distintos mRNAs que codifican para proteínas específicas de cada estadio (Boitani y col., 1980, Millette y Moulding, 1981).

Este programa de expresión de genes específicos para cada tipo celular es el resultado del control temporal de la transcripción génica por distintos factores. La identificación de estos factores reguladores y la elucidación de su función en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las células germinales requiere el análisis de la estructura y función de genes selectivamente activados durante la gametogénesis.

La meiosis es un proceso evolutivamente conservado desde las levaduras (McLeod, 1989) hasta los mamíferos, en todos los organismos de reproducción sexual, siendo sus aspectos básicos idénticos en ambos sexos. Aunque se desconocen sus etapas y el desarrollo citológico y genético, no existe mucha información sobre los mecanismos moleculares implicados en la activación de señales o

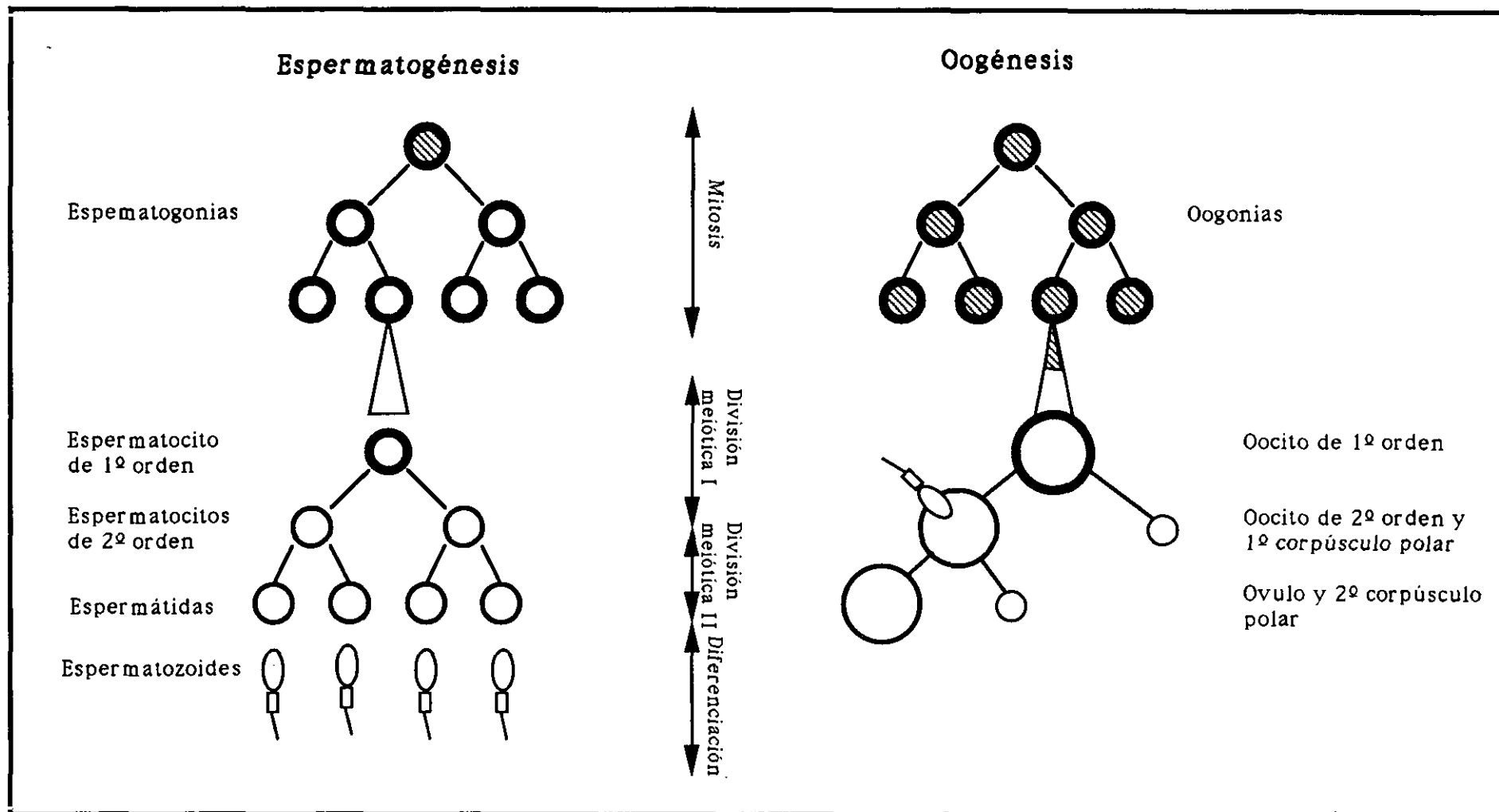


Figura 1: Esquema comparativo de la espermatogénesis y la oogénesis. Los círculos de trazo grueso indican estados diploides y los de trazo fino haploides. Las zonas rayadas corresponden a la vida fetal.

de los genes requeridos para llevar a cabo y mantener los acontecimientos de diferenciación a lo largo de dicho proceso.

La gametogénesis de ratón proporciona un buen sistema para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación de las células de mamíferos.

En éstos, el desarrollo de los oocitos (oogénesis) (Fig. 1) comienza cuando las células germinales primordiales migran hacia la gónada en formación y se convierten en oogonias; tras un periodo de proliferación mitótica, las oogonias se diferencian en oocitos primarios que empiezan la profase de su primera división meiótica. Cada cromosoma, consistente en 2 cromátidas, se aparea con su cromosoma homólogo posibilitando el entrecruzamiento entre las cromátidas de estos cromosomas apareados, la recombinación génica y fundamentalmente, la segregación cromosómica correcta. Después de esta etapa (paquitena), los cromosomas que conforman el bivalente, comienzan a desaparecerse generándose la fase de diplotena. Es en este momento de la profase, denominado dictiotena, donde el proceso se detiene durante un periodo de tiempo que oscila entre unos cuantos días y muchos años según la especie (Borum, 1966). Durante esta fase, los oocitos primarios adquieren las cubiertas externas y los gránulos corticales, acumulan ribosomas, mRNA, vitelo, glucógeno y lípidos y de este modo se preparan para llevar a cabo el programa de desarrollo.

La siguiente fase del desarrollo del oocito, denominada "maduración" empieza con la madurez sexual. Bajo la influencia de varias hormonas y factores de crecimiento, continúa la división I de la meiosis: los cromosomas se recondensan, la envoltura nuclear se rompe y los cromosomas homólogos se segregan a 2 núcleos hijos. El

citoplasma se divide de una forma muy asimétrica, produciendo 2 oocitos secundarios de un tamaño muy diferente; uno es un pequeño corpúsculo polar y el otro es una gran célula que contiene todo el potencial de desarrollo.

Finalmente se produce la división II de la meiosis: las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma se separan gracias a un proceso análogo a la anafase mitótica y el citoplasma del oocito secundario grande se divide de nuevo asimétricamente dando lugar a un óvulo maduro, ya fecundado, y a otro pequeño corpúsculo polar, cada uno con un número haploide de cromosomas sencillos. Todos los corpúsculos polares son pequeños y más tarde degeneran.

En machos, la espermatogénesis (Fig. 1) comienza en la pubertad y desde entonces, se produce de una forma continua (Bellve y col., 1977). Las células germinales inmaduras (espermatogonias) están situadas a lo largo del borde externo de los túbulos seminíferos, junto a la lámina basal, donde se dividen continuamente por mitosis. Algunas de las células hijas cesan en su proliferación y se diferencian a espermatocitos de primer orden; estas células entran en la primera profase meiótica, en la que los cromosomas homólogos apareados participan en el entrecruzamiento y la recombinación y luego continúan con la división I de la meiosis produciendo 2 espermatocitos de segundo orden, cada uno de los cuales contiene la mitad de los cromosomas replicados. Cada cromosoma está formado aún por dos cromátidas hermanas y después los dos espermatocitos de segundo orden sufren la división II de la meiosis produciendo 4 espermátidas con un número haploide de cromosomas. Estas espermátidas haploides sufren luego la diferenciación morfológica a espermatozoides maduros.

Durante la primera profase meiótica ocurren profundos cambios morfológicos en los cromosomas cuando se sinapsan y se separan. Dichos cambios morfológicos han permitido establecer una serie de etapas secuenciales: leptotena, zigotena, paquitena, diplotena y diacinesis (Moens, 1987). Se inicia la etapa de zigotena cuando comienza la sinapsis entre cromosomas homólogos hasta formarse el complejo sinaptonémico. En cuanto la sinapsis se ha logrado a nivel de todos los cromosomas se dice que la célula está en la fase de paquitena. En esta etapa aparecen nódulos de recombinación que posibilitan los sobrecruzamientos cromosómicos entre dos cromátidas no hermanas. La desinapsis comienza en la fase de diplotena; el complejo sinaptonémico se disgrega y permite que los dos cromosomas homólogos de cada bivalente se separen. Sin embargo, cada bivalente permanecerá unido a través de uno o más quiasmas, que representan los puntos donde se produjo el entrecruzamiento (Moens, 1987). De la fase de diplotena se pasa de una forma imperceptible a la diacinesis, la etapa de transición a la metafase.

Los oocitos de ratón han mostrado tener cromosomas formando estructuras "lampbrush" durante la diplotena (Baker y Franchi, 1967, Miller y Bakken, 1972). En anfibios, es muy conocido que el estado lampbrush es muy activo en cuanto a la síntesis de RNA (Gall y Callan, 1962).

Speed (1982) estudió la composición celular, de cada estadio meiótico, del ovario fetal en los diferentes días de gestación. Observó que los oocitos entran y pasan a través de la profase meiótica con un cierto grado de sincronía ya que el ovario fetal de un determinado día sólo contiene oocitos en uno o dos estadios de la profase meiótica (Tabla 1).

Días (p.c.)	Pre-leptotena	Leptotena	Zygotena	Paquitena	Diplotena	Dictiotena
13	96%	4%				
14	78%	17%	5%			
15	36%	36%	6%	22%		
16	18%	7%	3%	72%		
17	22%	10%	2%	66%		
18	0.7%	8.3%	0.3%	79%	11.7%	
19				21.7%	42%	36.3%
20				1.6%	7.7%	90.7%

Tabla 1. Composición del estado meiótico en ovarios fetales de ratón. Datos obtenidos de Speed(1982).

En el día 13, el 96% de las oogonias están todavía proliferando por divisiones mitóticas y algunos oocitos han entrado en leptotena (4%). En el día 16, la mayoría de los oocitos se encuentran en paquitena (72%), una pequeña parte queda en leptotena (7%) y queda un 18% en preleptotena. En el día 17, el 66% de los oocitos están en paquitena aunque quedan algunos en zigotena y leptotena. Unos 2 días después del nacimiento todos los oocitos están en dictiotena. Cuando han pasado 10 días desde el nacimiento, los oocitos en dictiotena están recubiertos por células foliculares.

El número total de oocitos en el ovario maduro es muchísimo menor que en los días 16 y 17 fetales debido al gran número de oocitos que degeneran. En la pubertad sólo existe un 5% de los oocitos generados en la vida fetal.

En cuanto a la síntesis de RNA, Bakken y McClanahan (1978) postularon que la síntesis es mayor en leptotena, comienza a disminuir en zigotena y casi no se detecta en paquitena temprana, aunque en paquitena tardía se dispara de nuevo.

El patrón de síntesis de RNA descrito para oocitos fetales de ratón es similar al observado en oocitos de rata y mono (Baker y col., 1969). En anfibios, los datos disponibles indican que el RNA es sintetizado en oocitos en estado de dictiotena, durante la fase cromosómica lampbrush (Gall y Callan, 1962).

Para muchas especies es bien conocido que el RNA sintetizado y almacenado en los oocitos durante la ovogénesis es requerido para el desarrollo embrionario temprano, como ocurre en anfibios (Davidson, 1976).

Todos los estudios realizados en ratón son cuantificaciones de RNA sintetizado por medida de incorporación de uridina tritiada, pero se sabe muy poco sobre qué tipos de RNAs son los sintetizados

durante la profase meiótica temprana, debido fundamentalmente al pequeño tamaño de los ovarios en el periodo fetal; sin embargo, los resultados existentes apoyaban la idea de que estos RNAs podrían ser usados en la embriogénesis temprana (Jahn y col., 1976).

La espermatogénesis en mamíferos es una continua diferenciación celular en la que pueden distinguirse tres fases: proliferación, meiosis y espermiogénesis (Fig. 1).

La fase inicial de proliferación espermatogonial consiste en divisiones mitóticas de las células goniales para originar secuencialmente pre-espermatogonias, espermatogonias tipo A, espermatogonias intermedias y espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B darán lugar a células en preleptotena que habrán sufrido replicación de DNA antes de entrar en la profase meiótica.

La profase meiótica incluye los estados de leptotena, zigotena, paquitena, diplotena y termina con la primera división reduccional para formar los espermatocitos secundarios. Las células entran rápidamente en la segunda división y dan lugar a las espermatidas haploides, denominadas espermatidas redondas.

La espermiogénesis, la etapa final de la espermatogénesis, consiste en una serie de cambios morfológicos de la célula germinal haploide que da lugar a espermatidas condensadas o elongadas y finalmente, al espermatozoide y su liberación en el túbulo seminífero.

Bellve y col. (1977) determinaron la composición de tipos celulares para cada uno de los días del desarrollo del testículo prepuberal de ratón (Tabla 2). En el día 8 después del nacimiento aparecen las primeras espermatogonias tipo A y B, que entran en la profase meiótica y alcanzan el estado de paquitena en el día 14 y terminan su diferenciación en el día 20; a diferencia de lo que ocurre

Tipo celular	Días (después del nacimiento)							
	6	8	10	12	14	16	18	20
Espermatogonia primitiva	16	-	-	-	-	-	-	-
Espermatogonia tipo A	-	17	7	7	6	9	3	4
Espermatogonia tipo B	-	10	11	8	6	8	7	6
Espermatocito-preleptotena	-	-	15	11	9	5	10	7
Espermatocito-leptotena	-	-	15	12	13	5	5	9
Espermatocito-zygotena	-	-	-	23	14	7	8	8
Espermatocito-paquitena	-	-	-	-	15	27	36	33
Espermatocitos secundarios	-	-	-	-	-	-	1	1
Espermátidas redondas	-	-	-	-	-	-	1	4
Células Sertoli	84	73	52	39	37	39	29	28

Tabla 2. Aparición temporal de las células espermátogénicas en testículo de ratón prepuberal.

en el ovario, éste es un proceso continuo. Así, en testículo adulto existe una acumulación de todos los tipos celulares.

Existen muchas evidencias de que la síntesis de RNA se produce durante uno o más estadios de la profase meiótica (Brasiello, 1968, Das y Alfert, 1966, Das y col., 1965, Henderson, 1963, Henderson, 1964, Monesi, 1965, Utakoji, 1966).

Kierszenbaum y Tres (1974) demostraron, por experimentos de incorporación de uridina tritiada y por ensayos de detección de actividad RNA polimerasa, que el periodo máximo de síntesis de RNA es el de paquitena media, comparado con el de leptotena, zigotena, paquitena tardía y diplotena. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Monesi (1965), Söderstrom y Parvinen (1976) y Hecht (1986).

Interacción entre las células germinales y las células somáticas:

Tanto en la oogénesis como en la espermatogénesis participan dos tipos de componentes celulares (Fig. 2): las células germinales, oogonias y espermatogonias que se transformarán en óvulos y espermatozoides, y células somáticas con funciones endocrina, autocrina y paracrina, que son cruciales para el desarrollo de la gametogénesis. Estas son las células de la granulosa o foliculares (oogénesis) y las células de Sertoli y Leydig (espermatogénesis).

Las interacciones celulares en el ovario de mamíferos entre las células germinales y los componentes celulares somáticos son cruciales para su desarrollo y función. Estas interacciones están mediadas por las uniones entre sus membranas y por factores paracrinós. La comunicación entre las células somáticas y el oocito es

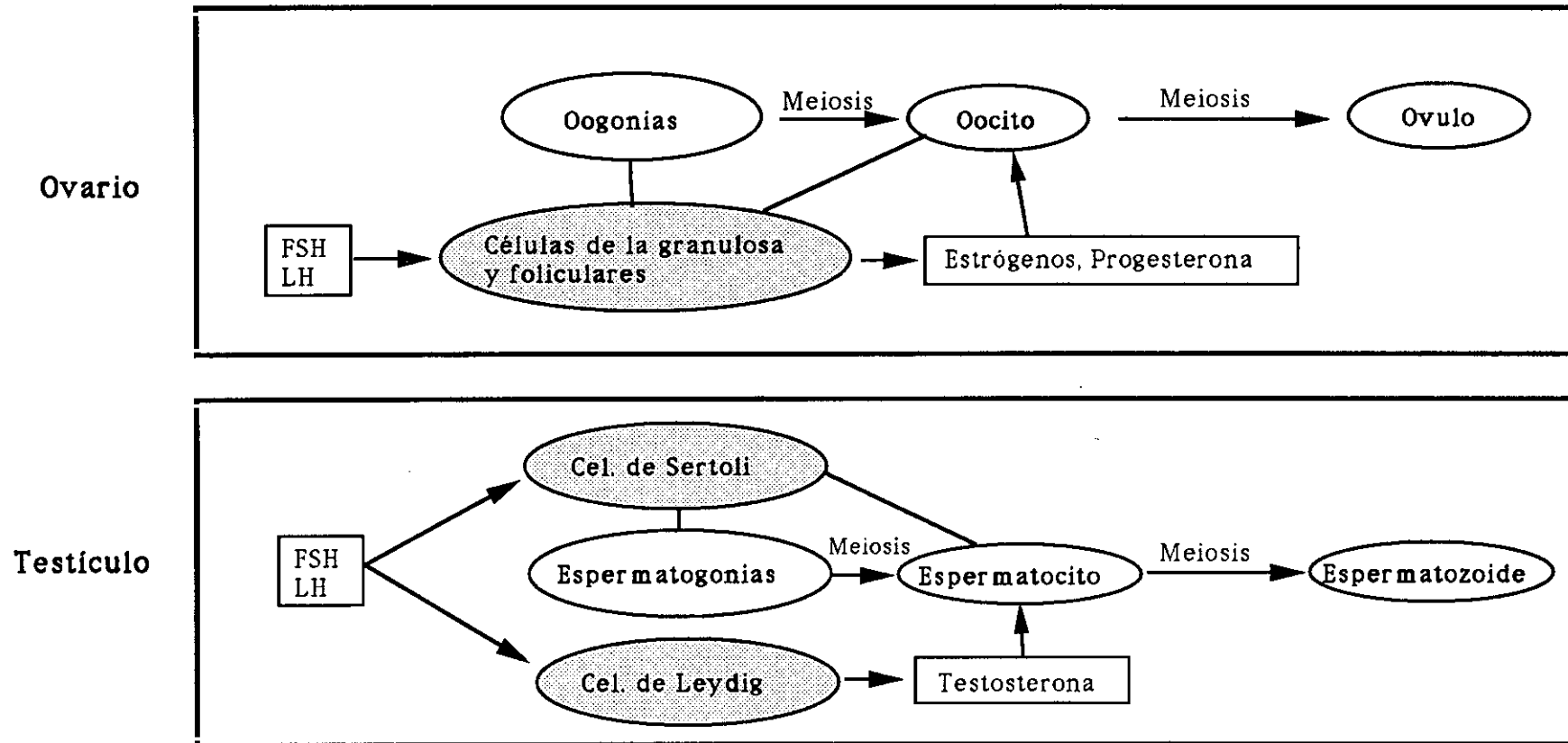


Figura 2: Esquema representativo de las interacciones que se producen en las gónadas entre los componentes somáticos y germinales.

esencial para el crecimiento del oocito y para la regulación de la maduración meiótica. En particular, las células de la granulosa proporcionan los nutrientes y las señales moleculares que regulan el desarrollo del oocito y producen progesterona, estrógenos y algunos factores proteicos como la inhibina, activina y el activador tisular del plasminógeno (Ness y Kasson, 1992). Por otro lado, los oocitos promueven la organización del folículo, la proliferación de las células de la granulosa y su diferenciación.

Las células de la línea somática y la línea germinal interaccionan desde los estadios más tempranos del desarrollo del ovario. Estas interacciones están reguladas por señales extrafoliculares, como son las gonadotropinas, FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) secretadas por la pituitaria anterior.

A lo largo del desarrollo folicular, las células de la granulosa se comunican entre ellas y con el oocito por uniones en poro (Albertini y Anderson, 1974, Anderson y Albertini, 1976, Gilula y col., 1978). Estos canales a través de la membrana plasmática permiten el intercambio de moléculas de bajo peso molecular, incluidas aquellas que participan en mecanismos de transducción de señal, como el cAMP (Lawrence y col., 1978). Además, los mecanismos paracrinos también juegan un papel importante en la función y en la diferenciación. La fosforilación y defosforilación de proteínas son mecanismos comunes para la regulación de la función celular. El patrón de fosforilación de proteínas en los oocitos está regulado por las células de la granulosa y depende de la existencia de esas uniones en poro (Colonna y col., 1989).

Como ya se ha descrito, los reguladores principales de las células de la granulosa son la hormona folículo-estimulante (FSH) y la

hormona luteinizante (LH) que actúan a través de mecanismos dependientes de cAMP. La FSH induce la activación de una serie de genes de la granulosa incluídos algunas enzimas esteroideogénicas (Richards y Hedin, 1988), inhibina (Turner y col., 1989), la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) (Ratoosh y col., 1987) y el activador tisular del plasminógeno (O'Connell y col., 1987, Ohlsson y col., 1988). Aunque se sabe que la PKA actúa de mediador en la acción de las hormonas FSH y LH, los mecanismos intermedios entre la activación de la PKA y la inducción génica no están del todo esclarecidos.

Los mRNAs de *c-fos* y *c-jun* son inducidos de forma transitoria y rápida en muchos tipos celulares por una amplia variedad de estímulos como agentes mitogénicos, factores de diferenciación, ésteres de forbol y agentes que hacen incrementar las concentraciones de Ca^{2+} y cAMP intracelular (Curran, 1988). La traducción de estos mRNAs permite la producción de las proteínas Fos y Jun que dimerizan en estructuras de cremallera ("leucine zipper") para formar la proteína AP-1. Entonces AP-1 se une a secuencias específicas de DNA, en su región reguladora 5', y son capaces de controlar así la transcripción génica.

El mRNA de *c-fos* ha sido detectado en las células de la granulosa de rata por Delidow y col. (1990). Por otro lado, Ness y Kasson (1992) demostraron que los niveles de mRNA de *c-fos* y *c-jun* aumentan rápidamente y de forma transitoria en las células de la granulosa de rata, en respuesta a gonadotropinas, derivados de cAMP y ésteres de forbol. Además estos efectos son dependientes de la dosis.

El papel de las proteínas Fos y Jun en las células de la granulosa todavía no se ha esclarecido. Se podría pensar que el heterodímero

AP-1 sirve de intermediario en la activación génica estimulada por gonadotropinas.

Las gonadotropinas han mostrado también regular la expresión de proto-oncogenes en células testiculares. En células de Sertoli en cultivo, la FSH induce de forma transitoria el mRNA de *c-fos* de manera dependiente de la dosis (Hall y col., 1988), mientras que en las células de Leydig, las gonadotropinas estimulan la expresión de *c-fos*, *c-myc* y *jun B*, pero no de *c-jun* (Czerwicz y col., 1989, Hall y col., 1991). Además, los derivados del cAMP mimetizan las mismas respuestas en ambos tipos celulares. Otros ligandos acoplados a la adenilato ciclasa como los agonistas adrenérgicos también regulan los genes *c-fos* y *c-jun* (Barka y col., 1986, Iwaki y col., 1990, Reuse y col., 1990).

Sin embargo, en otros tipos celulares, la activación de las vías del cAMP no tienen efecto (Mehmet y col., 1988) o atenúan la expresión de *c-fos* y *c-jun* (Chiu y col., 1989, Tamir y Isakov, 1991). Por tanto, la inducción temprana de genes, mediada por cAMP parece ser un fenómeno específico del tipo celular.

Todas estas observaciones sugieren que la regulación del programa de la gametogénesis es dependiente, de forma parcial, de la transducción de señales intercelulares.

Expresión temporal de genes reguladores durante la gametogénesis:

La espermatogénesis y oogénesis en mamíferos proporcionan un excelente sistema para estudiar la expresión de genes durante el proceso proliferativo y de diferenciación al que se someten estos tipos celulares.

Recientes estudios indican que los proto-oncogenes juegan papeles importantes en los programas genéticos que regulan la proliferación celular, la diferenciación y el desarrollo.

Los oncogenes intracelulares o transmembranales con actividad tirosina quinasa, como por ejemplo, *src*, *abl*, *erbB*, han demostrado modular la expresión génica durante el desarrollo (a través de segundos mensajeros) mediante la fosforilación, específica del estadio, de las proteínas diana (Hunter, 1987, Cooper, 1987, Yarden y Ullrich, 1988). Otros proto-oncogenes, incluidos *c-fos*, *c-jun* y *c-myc* han demostrado actuar de forma directa en el nivel transcripcional para activar la expresión génica (Bishop, 1983, Curran y Morgan, 1985, Rauscher y col., 1988).

La expresión específica del estadio de algunos proto-oncogenes durante la espermatogénesis sugiere que la transducción de señales, que facilitan el acoplamiento de los receptores de la superficie celular con los acontecimientos de expresión génica en el núcleo, parece estar altamente conservada entre una amplia variedad de tipos celulares implicados en la proliferación celular y la diferenciación (Sorrentino y col., 1988, Takahashi y col., 1988, Meijer y col., 1987, Oppi y col., 1987, Zacheri y col., 1988, Goldman y col., 1987, Wolgemuth y col., 1987).

La naturaleza pleiotrópica de la mayoría de las mutaciones que afectan a la espermatogénesis constituye una evidencia indirecta adicional que apoya la noción de la redundancia funcional entre estas moléculas reguladoras (Handel, 1987).

Ponzetto y Wolgemuth (1985) y Oppi y col. (1987) demostraron la presencia de un único transcrito de *c-abl* (tirosina quinasa) de 4.7 Kb en células espermáticas. Shackleford y Varmus (1987) y Mutter y Wolgemuth (1987) demostraron un patrón similar de expresión

postmeiótica para transcritos de *c-mos* (serina-treonina quinasa). Estudios adicionales de Meijer y col. (1987) y Propst y Vande Woude (1985) sugirieron que el transcrito de *c-abl* truncado, encontrado en las células germinales (4.7 Kb comparado con el de 6 Kb de las células somáticas) era debido a una diferente especificidad de secuencia en el extremo 3' para la terminación transcripcional y la poliadenilación. Al contrario que *c-abl*, los transcritos de *c-mos* en células somáticas y germinales tienen secuencias idénticas en su extremo 3' pero cambian su extremo 5' debido al uso de diferentes sitios de iniciación (Propst y col., 1987).

Por otro lado, algunos estudios realizados por Leon y col. (1987) y Sorrentino y col. (1988) indicaron que los miembros de la familia *ras* se expresan de forma diferencial durante el desarrollo de las células germinales. *H-ras* se expresa en muy bajos niveles durante la espermatogénesis. Sin embargo, *K-ras* muestra elevados niveles de expresión en espermátocitos en paquitena y *N-ras* se expresa de forma abundante en espermátidas. La expresión diferencial de los respectivos transcritos de *ras* en células germinales podría estar regulada por sus secuencias no codificantes del extremo 3'. Dichas secuencias, al igual que para *c-abl*, parecen contribuir a la estabilización de los mRNAs específicos de cada tipo celular (Leon y col., 1987).

También se ha estudiado la expresión temporal de *c-fos* en células de testículo (Sorrentino y col., 1988). Se han detectado niveles significativos de transcritos de *c-fos* en espermátocitos en paquitena y menores niveles en espermátidas haploides.

Takahashi y cols. (1988) identificaron otro factor de transcripción expresado de forma diferencial en las células germinales masculinas. El producto del gen *ret* es una tirosina

quinasa truncada que contiene dominios de unión a metales y a ácidos nucleicos, denominados estructuras "zinc-finger" (Evans y Hollenberg, 1988, Freedman y col., 1988). Este posible factor de transcripción fue detectado en espermátocitos en paquitena y en espermátidas.

También se han encontrado isoenzimas específicas de testículo, como ocurre con la lactato deshidrogenasa (LDH-C) (Thomas y col., 1990), fosfoglicerato quinasa (PGK-2) (Robinson y col., 1989), el citocromo c (Virbasius y Scarpulla, 1988, Hake y col., 1990), o la histona H2B específica de testículo (Moss y col., 1989).

En otros casos se han descrito genes que muestran una expresión alternativa en testículo, por lo que aparecen nuevos transcritos en estos tejidos, como se da con la β -1,4-galactosil-transferasa (Shaper y col., 1990) o el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGFr) (Ayer-LeLievre y col., 1988).

Además, estudios en la región promotora de la protamina 1 (Peschon y col., 1989), protamina 2 (Bunick y col., 1991), fosfoglicero-quinasa-2 (Robinson y col., 1989) y la histona H2B específica de testículo (Hwang y col., 1990), han revelado la presencia de motivos de DNA que controlan su actividad transcripcional durante la espermatogénesis.

La casi totalidad de los estudios se han realizado, hasta hoy, durante la espermatogénesis, ya que, como se ha dicho anteriormente, se produce en individuos ya nacidos y es más fácil su análisis por el enriquecimiento de los distintos tipos celulares.

Como se ha visto hasta ahora, tanto la ovogénesis como la espermatogénesis son dos procesos de proliferación y diferenciación en los que participan multitud de factores reguladores y cuyos mecanismos de actuación son todavía desconocidos. Entre ellos están

todos aquellos implicados en la transducción de señales entre los componentes somáticos y germinales en ambos sistemas; otros son los que inducen el disparo de la meiosis de forma diferencial en machos (que se produce después del nacimiento y de una forma continua) y en hembras (que se produce en la vida fetal de forma sincronizada).

Del mismo modo, deben existir señales que provoquen la parada de la meiosis durante la oogénesis, en el nacimiento, en el estadio de dictiotena, hecho que se ha conservado evolutivamente entre todas las hembras de mamíferos. Estas señales que impiden que la meiosis progrese en hembras cuando se ha llegado a la dictiotena podrían tener una función similar durante la vida fetal en machos y por ello se impide el comienzo de la meiosis hasta después del nacimiento.

Por último, el estímulo de determinadas hormonas provoca el reinicio meiótico y la maduración de los oocitos, en hembras, por una serie de mecanismos que, aunque han sido más estudiados, se desconocen muchas de sus bases moleculares.

Por este motivo, el interés de este trabajo se centra en el aislamiento y la caracterización de genes que se están expresando durante la gametogénesis en ratón.

Dado que, como se ha descrito anteriormente, el estado de paquitena de la primera profase meiótica es muy activo transcripcionalmente y dado que, en los ovarios fetales de ratón se produce una sincronización celular tal que, dependiendo del día del desarrollo, existe un enriquecimiento de cada población celular, se pretenden construir genotecas de cDNA a partir de RNA total extraído de ovarios fetales en los que exista un alto porcentaje de células en paquitena.

En estas genotecas se podrán seleccionar, por análisis diferencial, aquellos clones que se expresen también en testículo adulto de ratón (ya que podrían tener una función similar) y no se expresen o lo hagan de forma minoritaria en los tejidos somáticos del mismo día del desarrollo.

De este modo se podrán aislar cDNAs correspondientes a transcritos que, aunque tengan una función determinada en los tejidos somáticos, su elevada expresión en los dos sistemas (ovario y testículo) sea indicio de su implicación en el proceso de la gametogénesis.

El estudio del patrón de expresión de estos genes a lo largo de la gametogénesis así como de la existencia o no de transcritos alternativos en los tejidos gonadales respecto a los somáticos permitirá obtener más información sobre el efecto regulador de cada uno de ellos, durante el proceso proliferativo y de diferenciación al que están sometidos estos tipos celulares.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo se centra en el aislamiento y la caracterización de genes que se están expresando durante la gametogénesis en ratón. Dado que el estadio de paquitena de la primera profase meiótica es muy activo transcripcionalmente y dado que, en los ovarios fetales de ratón se produce una sincronización celular tal que, dependiendo del día del desarrollo, existe un enriquecimiento de cada población celular, se pretenden construir genotecas de cDNA a partir de RNA total extraído de ovarios fetales en los que exista un alto porcentaje de células en paquitena.

En esas genotecas se podrán seleccionar, por análisis diferencial, aquellos clones que se expresen también en testículo de ratón adulto (ya que podrían tener una función similar) y no se expresen o lo hagan de una forma minoritaria en los tejidos somáticos del mismo día del desarrollo.

También es de nuestro interés el estudio del patrón de expresión, de todos los clones seleccionados, durante el proceso de la gametogénesis en ratón.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Reactivos:

Las sales, ácidos, alcoholes y en general los productos comerciales procedieron de Sigma, Merck, Panreac y Boehringer Mannheim. Los productos utilizados para electroforesis de geles fueron proporcionados por Bio-Rad y FMC y el material microbiológico por Difco.

Soluciones y Tampones:

- **H₂O-DEPC**: Se añadió DEPC al 0.1% (v/v) al H₂O, se agitó vigorosamente y se mantuvo a 37°C durante 20 horas. Después se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

- **IPTG**: 20mg/ml en H₂O, guardado en alícuotas a -20°C.

- **X-Gal**: 20 mg/ml en dimetilformamida, guardado a -20°C.

- **Fenol**: a 500 g de fenol (Merck) licuado se le añadieron 0.5 g de 8-hidroxiquinoleína. Este compuesto es un antioxidante, un inhibidor parcial de las RNasas, un débil agente quelante y su color amarillo permite identificar la fase fenólica.

El fenol se ajustó a pH > 7.8 mediante agitación con un volumen de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 durante unos 10 min. Por decantación se separó el fenol y se repitió el proceso con Tris-HCl 10 mM pH 8.0 el número de veces necesarias hasta que la fase acuosa alcanzó un pH superior a 7.8. Una vez preparado se almacenó a -20°C.

- **PBS:** NaCl 170 mM, KCl 3.35 mM, KH_2PO_4 1.83 mM, Na_2HPO_4 8.03 mM, pH 7.4.

- **Solución Denhardt-50X:** Ficoll 400 (Sigma) 1% (p/v), PVP-360 1% (p/v), BSA 1% (p/v). Se filtró y se guardó en alícuotas a -20°C .

- **SSC-1X:** NaCl 150 mM, Citrato sódico 15 mM, pH 7.0.

- **Solución de Prehibridación:** Formamida 50% (v/v), solución Denhardt-5X, SSC-5X, SDS 0.25% (p/v), DNA de espermatozoos de salmón a 100 $\mu\text{g/ml}$ previamente sonificado y desnaturalizado.

- **Solución de Hibridación:** solución de prehibridación más sulfato de dextrano al 10% (p/v).

- **Solución de Desnaturalización:** NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M.

- **Solución de Neutralización:** Tris-HCl 1 M, pH 8.0, NaCl 1.5 M.

- **Tampón TBE:** Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2mM, pH 8.0.

- **Tampón TAE:** Tris-base 1.6 M, acetato sódico 0.8 M, EDTA 40 mM, pH 7.2.

- **Tampón TE:** Tris-base 10 mM, pH 7.5, EDTA 1mM, pH 8.0.

- **MOPS-10X:** MOPS 0.2 M, acetato sódico 80 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0.

- **Tampón SM:** NaCl 0.1M, MgSO₄ 10 mM, Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM, gelatina 0.01% (p/v).

- **Solución de Acrilamida al 20%:** Acrilamida 20% (p/v), N,N'-metilenbisacrilamida 0.67 % (p/v), Urea 46% (p/v). Una vez disueltos y enrasado hasta su volumen final se añadió Amberlita MB-3 2% (p/v), se agitó durante 30 min, se filtró y se guardó así a temperatura ambiente.

- **Solución de Urea al 46%:** Urea 46% (p/v). Una vez ajustado al volumen final, se añadió Amberlita MB-3, 2% (p/v), se agitó durante 30 min y se guardó así a temperatura ambiente.

Medios de cultivo:

- **Medio LB:** Triptona 1% (p/v), Extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 85 mM, pH 7.5.

- **Top-Agar:** Medio LB más agar al 0.75% (p/v).

- **Medio LB sólido para placas:** Medio LB más agar al 1.5% (p/v). Para cultivos específicos, el medio LB fue suplementado con alguno de estos componentes:

- MgSO₄: 10 mM
- Maltosa: 0.2% (p/v)
- Ampicilina: 50 µg/ml

- Tetraciclina: 12.5 µg/ml
- IPTG: 0.5 mg/ml
- X-Gal: 80 µg/ml

Estirpes:

- **Bacterias:** XL1-Blue y SURE modificadas por Stratagene (Bullock y cols., 1987).
- **Bacteriófagos:** procedieron de Stratagene:
 - λ-ZAP: derivado de λ y del plásmido pBluescript, en la versión λ-ZAP II (Uni-ZAP XR^R) el cual puede ser excindido *in vitro* bajo la infección por fagos auxiliares (Short y cols., 1988).
 - R408: fago auxiliar.
- **Plásmidos:**
 - pBluescript: contiene una región de 21 posibles sitios de clonaje, flanqueada por los promotores T3 y T7 (Yanisch-Perron y col., 1985).
- **Estirpe de ratón:** *Mus musculus* Swiss.

Enzimas:

Todas las enzimas usadas procedieron de Boehringer Mannheim, Promega, Stratagene, Pharmacia, Clontech, Amersham.

Membranas y Filtros:

- Los filtros de nitrocelulosa a los que se transfirieron las colonias de bacteriófagos eran de Schleicher-Schuell.

- Las membranas de nylon (Zeta-Probe) usadas para transferir RNA o DNA procedieron de Bio-Rad.

Precursores radiactivos:

- (α - ^{35}S)-dATP: 3000 Ci/mmol de Amersham.
- (α - ^{32}P)-dCTP: 3000 Ci/mmol de Dupont.
- (α - ^{32}P)-dATP: 3000 Ci/mmol de Amersham.

Fotografía y Autorradiografía:

Se usaron películas fotográficas en blanco y negro Polaroid (52, 54, 667). Las autorradiografías fueron Agfa o Kodak (X-Omat AR).

Productos suministrados conjuntamente para aplicaciones concretas (kits):

- Poly AT tract mRNA Isolation Systems (Promega): usado en la extracción de mRNA a partir de RNA total.
- ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene): con el que se realizó la síntesis de cDNA de cadena sencilla, de cadena doble y luego se ligó al bacteriófago λ -ZAP. También se utilizó para realizar excisiones *in vivo* de los bacteriófagos portadores de los clones de interés, para obtener el plásmido correspondiente.
- Gigapack II Gold packaging extract (Stratagene): extractos usados para empaquetar los fagos.

- **Riboclone cDNA Synthesis Sistem, Oligo(dT)** (Promega): con el que se construyeron las sondas marcadas de sscDNA, incorporando (α - ^{32}P)-dCTP.

- **T7 Sequencing Kit** (Pharmacia): con el que se llevó a cabo la secuenciación de cada uno de los clones.

- **Geneclean** (BIO 101 Inc.): con el que se purificaron fragmentos de DNA previamente separados en geles de agarosa.

- **Multiprime DNA Labelling System** (Amersham): se usó para el marcaje por "random priming" de fragmentos de DNA destinados a hibridación.

- **Magic Minipreps DNA Purification System** (Promega): utilizado en la extracción de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano, en pequeña escala.

METODOS

Tratamiento del material en contacto con RNA:

Con el fin de eliminar o inhibir la posible existencia de RNasas, se siguieron los siguientes procedimientos:

Todo el material de vidrio fue tratado en estufas a 200°C durante 2 horas y el material de teflón fue lavado con cloroformo.

Las cubetas y recipientes para geles y los homogeneizadores fueron lavados con NaOH 50 mM, después con ácido acético 50 mM y finalmente con H₂O-DEPC.

Todas las disoluciones fueron tratadas con DEPC o preparadas con H₂O tratada con DEPC para inhibir las posibles RNasas existentes.

Extracción de tejidos:

Los tejidos de ratón se extrajeron a partir de disecciones a la lupa de embriones correspondientes a distintos días del desarrollo y de ratones nacidos; fueron congelados directamente a -70°C y acumulados en tubos eppendorf hasta su uso posterior.

Las biopsias de testículo humano fueron obtenidas a partir de orquidectomías. El tejido extirpado fue directamente mantenido en PBS-DEPC a 4°C y procesado rápidamente. El material testicular procedía de pacientes con tumores de próstata, pero con desarrollo gametogénico normal, como se podía comprobar en las preparaciones citológicas (Fig. 6).

Preparaciones citológicas:

Con el fin de verificar citológicamente el desarrollo de la línea germinal de los ovarios fetales en la estirpe de ratón utilizada, se realizaron preparaciones celulares adaptando el método de Evans (1987) para tejidos embrionarios. Los ovarios disectados fueron lavados en PBS e inmediatamente fijados en metanol: ácido acético 3:1 (v/v) preparado fresco. Después de, al menos, 1 h. de fijación, cada ovario fue depositado en un portaobjetos con una gota de ácido acético al 60% (v/v), dejándolo actuar durante 2 min. y posteriormente dilacerando el tejido suavemente con agujas, a la lupa, hasta que se secaron completamente.

Las preparaciones fueron teñidas durante 5 min con Giemsa al 4% en tampón fosfato, pH 7.0, lavados con el mismo tampón y después con H₂O. Las preparaciones secadas al aire fueron examinadas al microscopio en contraste de fase o después de la tinción, para determinar la sincronía celular del estadio meiótico correspondiente al día de su desarrollo fetal (Fig. 6A).

Las preparaciones citológicas de testículo de ratón adulto y de testículo humano fueron obtenidas a partir de células del epitelio seminífero. Para ello, los túbulos seminíferos fueron disgregados mecánicamente mediante pinzas de punta fina, hasta obtener una suspensión monodispersa de células. Los fragmentos tubulares se dejaron sedimentar a gravedad durante 10 min. La suspensión de células fue centrifugada a 200 g. durante 5 min, se resuspendieron en PBS y se procedió dos veces del mismo modo. Finalmente, las células fueron fijadas resuspendiendo en 1 ml de fijador de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1) e incubando durante al menos 1 h a 4°C. La suspensión fue centrifugada a 300 g. durante 5 min y las células

se resuspendieron en fijador preparado fresco. Repitiendo este proceso durante 3 veces, al final se puso la suspensión celular sobre portaobjetos secos, dejando caer una gota de suspensión en cada uno, desde unos 20 cm para facilitar la extensión celular y cromosómica. Las preparaciones secadas al aire fueron examinadas al microscopio, por contraste de fase o bien después de tinción con Giemsa al 4% (Fig. 6B).

Extracción de RNA total a partir de los tejidos:

Se homogeneizaron (con homogeneizador de cuchillas Ultra-Turrax T25 a 10^4 rpm) 100 mg de tejido, previamente congelado, en 1 ml de una solución desnaturizante (Chomczynski y Sacchi, 1987) que contenía tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, pH 7.0, N-laurilsarcosina 0.5% (p/v) y β -mercaptoetanol 0.1 M. Al homogeneizado se le añadió 0.1 ml de acetato sódico 2 M, pH 4.0, 1 ml de fenol y 0.2 ml de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (49:1; v:v). Se agitaron vigorosamente durante 10 s y las muestras fueron centrifugadas a 10^4 g. durante 20 min a 4°C. Tras la centrifugación, el RNA quedó en la fase acuosa mientras que el DNA y las proteínas quedaron en la interfase y en la fase fenólica respectivamente.

La fase acuosa fue transferida a otro eppendorf y el RNA fue precipitado con 1 ml de isopropanol durante, al menos, 1 h a -20°C. Después se centrifugó a 10^4 g. durante 10 min y el precipitado fue resuspendido en 300 μ l de la solución desnaturizante inicial. Se añadieron 300 μ l de isopropanol para volver a precipitar durante 1 h a -20°C. Por último, tras centrifugar a 10^4 g. durante 10 min a 4°C, el RNA precipitado se resuspendió en H₂O tratada con DEPC, se midió la

densidad óptica a 260 y 280 nm y se ajustó el volumen para tener una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Minigeles de agarosa para RNA y DNA:

Se disolvió agarosa de alta temperatura de fusión en solución TBE o TAE, para tener una concentración del 1% (p/v), calentando la disolución en un microondas hasta fundir la agarosa. Se vertió en un formador de gel sobre el que se aplicó el peine de electroforesis y se dejó solidificar. Para fragmentos pequeños se mezcló agarosa de bajo punto de fusión al 3% (p/v) con agarosa de alta temperatura de fusión al 1% (p/v), en el tampón correspondiente, TBE o TAE.

Las muestras de DNA o RNA, diluídas en un pequeño volumen de H_2O , a una concentración aproximada de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, fueron desnaturalizadas durante 5 min a 65°C . Se añadió 1 μl de tampón de carga (0.25 % de azul de bromofenol (p/v), 50 % de glicerol (v/v) y 1% de SDS (p/v)) y se aplicaron en los respectivos pocillos.

La cubeta de electroforesis, con el tampón correspondiente (TBE o TAE), fue conectada a una fuente de alimentación a 75 voltios durante unas 2 horas.

Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 5 min, lavado con H_2O durante 10 min y después fotografiado, en película Polaroid, sobre un transiluminador con luz ultravioleta.

Aislamiento de poli(A)+-RNA a partir de RNA total:

Se usó el sistema " Poly AT tract mRNA Isolation Systems" de Promega y se siguieron las instrucciones recomendadas.

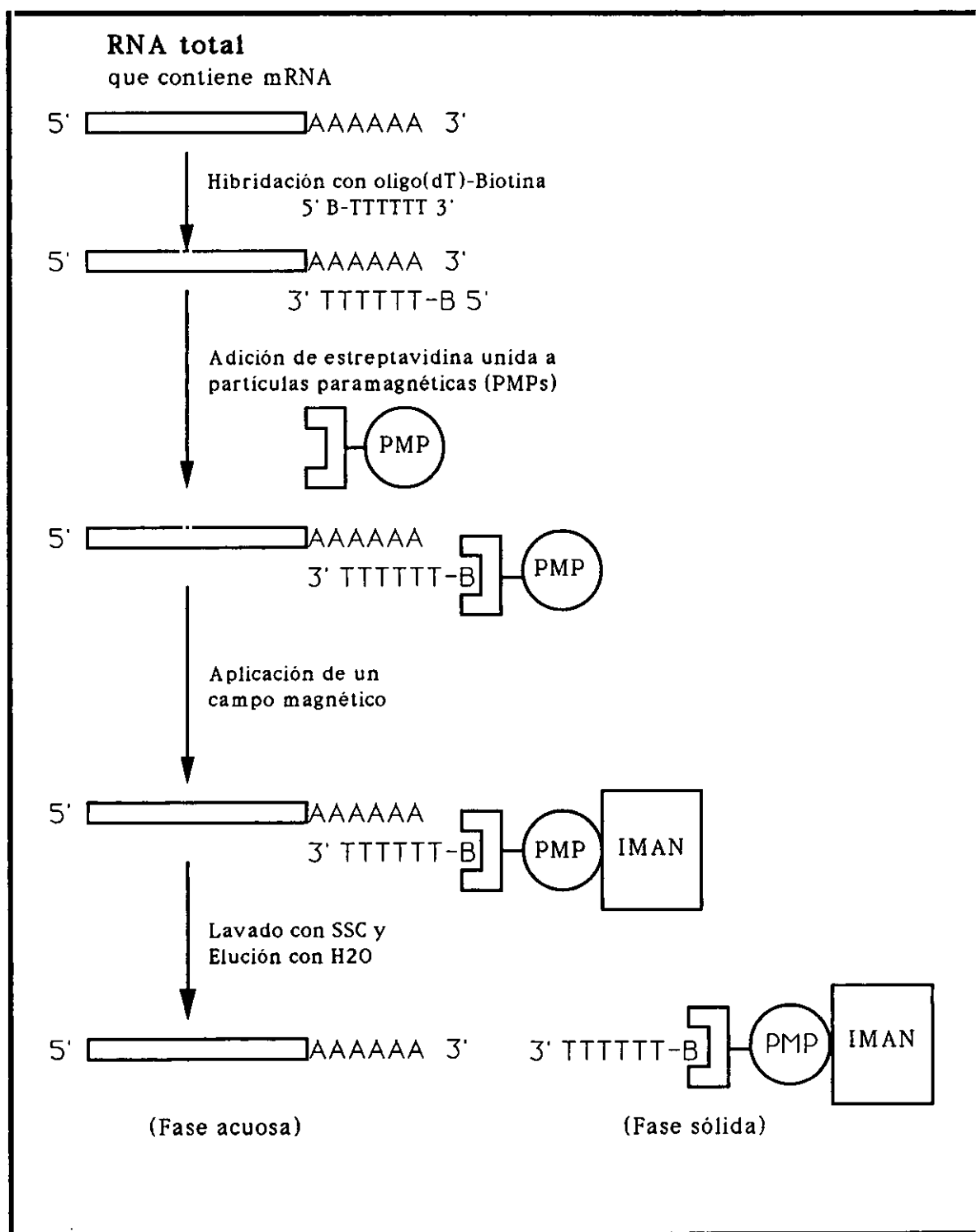


Figura 3. Esquema del sistema de extracción de mRNA

El sistema usa un oligo(dT) que está biotinado e hibrida con una alta eficiencia, en disolución, con la región 3' de poli(A) presente en la mayoría de los mRNAs de eucariotas. El híbrido así formado (Fig. 3) puede ser capturado por unión covalente entre la molécula de biotina y otra de estreptavidina adherida a una partícula paramagnética, que es atraída por un campo magnético. Una vez lavados dichos complejos con SSC-0.1X y eliminado todo el poli(A)⁻-RNA, el poli(A)⁺-RNA se eluye por simple adición de H₂O libre de RNasas.

Construcción de las genotecas de cDNA:

Para la obtención de los cDNAs y su integración en DNA de fagos λ-ZAP, se siguieron cada uno de los pasos indicados en el "ZAP-cDNA Synthesis Kit" de Stratagene, con las siguientes condiciones:

-Síntesis de la primera cadena de cDNA:

Para cada reacción se utilizaron 5 µg de poli(A)⁺-RNA y 45 u. de transcriptasa reversa del virus de leucemia murino (M-MuLVRT) en el tampón de reacción que contenía dATP, dGTP, dTTP (10 mM cada uno) y 5-metil-dCTP (5 mM) para evitar que la cadena sintetizada pudiera ser digerida por las enzimas de restricción usadas posteriormente (Fig. 4).

Como iniciador se usó el siguiente oligonucleótido de 50 bases que contenía una región poli(dT)₁₈, que reconocería el extremo poli(A) del mRNA, otro sitio de restricción XhoI y un fragmento de protección a estas dos denominado secuencia "GAGA":

5' GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTT....TTTT 3'

Secuencia GAGA

XhoI poli(dT)₁₈

El sitio de restricción XhoI permitiría posteriormente que el cDNA sintetizado pudiera ser insertado en el vector λ -ZAP de una forma orientada (EcoRI-XhoI) respecto al promotor LacZ (Short y col., 1988).

Con el fin de controlar el desarrollo de la reacción y el tamaño de los cDNAs, la síntesis de la primera cadena de cDNA se hizo paralelamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, en otro tubo. Se incubaron las reacciones a 37°C durante 1 hora.

-Síntesis de la segunda cadena de cDNA:

Sobre la reacción de síntesis de la primera cadena se añadieron dNTPs (a la misma concentración de antes) en el tampón de síntesis de la segunda cadena, 4 u. de RNasa H para degradar el RNA, del híbrido DNA-RNA. Muchos de los fragmentos de RNA producidos servirían de iniciadores a la DNA polimerasa I (67 u.) para la síntesis de la 2ª cadena. La mezcla de nucleótidos contenía dATP, dGTP, dTTP (10 mM cada uno) y dCTP 26 mM en lugar de 5-metil-dCTP para asegurar que la región XhoI fuera susceptible a la posterior digestión enzimática. Esta reacción se llevó a cabo durante 2.5 h a 16°C. Igual que en la reacción anterior, se realizó el control con precursor radiactivo.

Posteriormente, mediante una incubación a 37°C durante 30 min, con 10 u. de T4-DNA polimerasa, se rellenaron los extremos para convertirlos en romos.

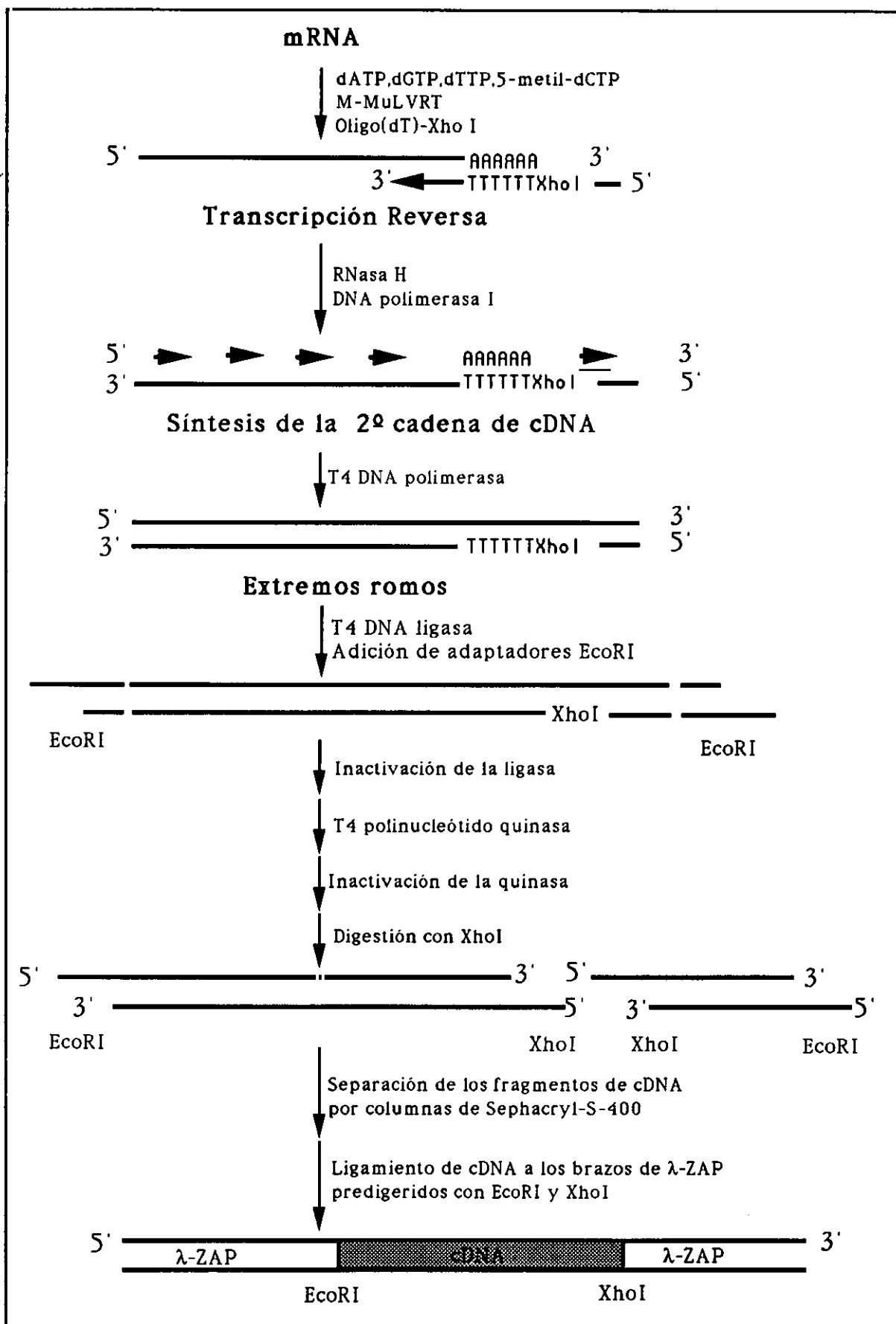


Figura 4. Esquema de la construcción de las genotecas de cDNA.

-Adición de adaptadores EcoRI:

El cDNA sintetizado se precipitó y se resuspendió en la solución que contenía los adaptadores EcoRI. Se incubó con 40 u. de T4-DNA ligasa durante 48 h a 8°C.

La secuencia de los adaptadores era:

5' AATTCGGCACGAG 3'

3' GCCGTGCTC 5'

El extremo romo tenía el grupo fosfato en la cadena 5', lo que permitiría la ligación del cDNA, mientras que el extremo cohesivo estaba desfosforilado para evitar la unión por extremos cohesivos entre sí.

Una vez que la reacción finalizó, la T4-DNA ligasa fue inactivada calentando el tubo a 70°C durante 30 min. Después, sobre la misma reacción, se añadieron 10 u. de T4 polinucleótido quinasa y su tampón conteniendo ATP, para añadir el fosfato en los extremos cohesivos. Se incubó a 37°C durante 30 min y finalmente se inactivó volviendo a calentar a 70°C durante 30 min.

-Digestión con XhoI y ligamiento al vector λ-ZAP:

Todo el cDNA al que se había unido los adaptadores fue digerido con 135 unidades de XhoI, durante 90 min a 37°C. Así se liberaba un pequeño fragmento del extremo 3' que comprendía el adaptador EcoRI y un trozo del oligo unido al sitio XhoI (Fig. 4).

Para separar el cDNA de los fragmentos pequeños se pasó la muestra por columnas de Sephacryl-S-400. Después, el cDNA fue precipitado y resuspendido en un tampón de reacción de la T4-DNA ligasa y se añadieron 1 µg del vector λ-ZAP (previamente digerido con EcoRI, XhoI y desfosforilado) y 2 u. de T4-DNA ligasa. Esta

reacción se incubó a 12°C durante 20 h y después a temperatura ambiente durante 2 h.

-Empaquetamiento de las genotecas:

Cada genoteca de cDNA en λ -ZAP fue empaquetada con un sistema de alta eficiencia usando los extractos de empaquetamiento "Gigapack II Gold" de Stratagene, según las condiciones especificadas por el proveedor (Kretz y Short, 1989a; Kretz y col., 1989b). Una vez empaquetada, se añadieron 500 μ l de tampón SM y 20 μ l de cloroformo. Se agitó el tubo, se centrifugó a 10^4 g. durante 5 min y se pasó la fase acuosa a otro tubo para su posterior titulación.

Amplificación de las genotecas de cDNA:

Un día antes de la amplificación se sembraron bacterias SURE (Stratagene), en medio líquido LB con MgSO_4 y maltosa (a las concentraciones descritas en materiales), hasta tener una D.O._{600nm}: 0.5. Estas bacterias se centrifugaron a 3000 g. durante 10 min, se decantó el sobrenadante y por cada 10 ml de cultivo, se resuspendieron en 4 ml de MgSO_4 10 mM.

La genoteca empaquetada se repartió en volúmenes iguales en 4 tubos y se mezcló cada uno con 600 μ l de la suspensión de células SURE. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 15 min. Después se añadieron 7 ml de top-agar (previamente calentado a 48°C para fundirlo), se mezclaron con las bacterias y se vertieron independientemente sobre placas de 150 mm, precalentadas a 37°C, que contenían LB sólido y tetraciclina (12.5 μ g/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 8h. Posteriormente se añadió sobre las

placas 10 ml de tampón SM sobre cada una y se guardaron a 4°C durante 20 h para que los fagos pasasen al SM.

Finalmente, se recogió el SM de las placas, se pasó a un tubo Falcon estéril, se le añadió 0.5 ml de cloroformo y se incubó a 20°C durante 15 min. Se centrifugó a 3000 g. durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo.

La genoteca así amplificada se almacenó en alícuotas a 4°C, con un 0.3% (v/v) de cloroformo y otras alícuotas a -80°C con un 50% (v/v) de glicerol.

Titulación de las genotecas de cDNA:

Se prepararon células SURE resuspendidas en MgSO₄ del mismo modo que se hizo para la amplificación y se hicieron diluciones sucesivas de la genoteca en tampón SM. Se mezclaron 10 µl de cada dilución con 100 µl de células SURE y se incubaron a 37°C durante 15 min. A cada tubo se añadió 2.5 ml de top-agar precalentado a 48°C y la mezcla se vertió sobre placas de 90 mm de diámetro que contenían medio LB con tetraciclina (12.5 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

El título de la genoteca se midió en unidades formadoras de placa (pfu) y resultó del siguiente cálculo:

$$n^{\circ} \text{ pfu}/\mu\text{l} = (n^{\circ} \text{ halos} \times \text{factor dilución})/10 \mu\text{l sembrados}.$$

Gel de poliacrilamida para cDNA:

Se polimerizó un gel vertical de poliacrilamida al 3.5% en solución TBE según protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989). Las muestras obtenidas tras la síntesis de la 2ª cadena de

cDNA, mediante el uso de precursores radiactivos, se desnaturalizaron a 85°C durante 5 min. Lo mismo se hizo con el cDNA sintetizado a partir de un mRNA control (1800 pb) contenido en el "kit" de λ -ZAP de Stratagene. Se cargaron todas las muestras en el gel y se conectó a 100 voltios durante 3 h. Se usó TBE como tampón de electroforesis. Como marcador de peso molecular se usó DNA de fago lambda cortado con StyI y marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP por el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, siguiendo instrucciones comerciales. El gel se secó sobre papel Whatman 3MM, 80°C durante 10 min, se colocó en un cassette de exposición junto a una película de autorradiografía y se dejó exponer durante 24 h. Después se reveló la radiografía usando un revelador automático Agfa.

Marcaje de DNA para construcción de sondas:

Las sondas destinadas a hibridación se marcaron usando el "Multiprime DNA labelling System" de Amersham. Se partió de 100 ng de DNA y se siguieron las instrucciones comerciales, incorporando en la reacción 30 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. El marcaje consistió en la adición de hexámeros de oligonucleótidos al azar y la posterior incorporación de nucleótidos para rellenar los huecos, mediante incubación durante 1 h a 37°C con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Feinberg y Vogelstein, 1983).

Al finalizar la reacción se pasó la sonda por una columna de Sephadex G-50 (Boehringer Mannheim) para separar los nucleótidos no incorporados. La sonda se desnaturalizó a 90°C durante 5 min y se añadió a la solución de hibridación.

Hibridación de fagos con sondas de DNA:

- Transferencia de fagos a filtros de nitrocelulosa:

Se sembraron los fagos en placas del mismo modo que para las titulaciones. Se incubaron a 37°C toda la noche y después a 4°C durante 3 h. Se puso un filtro de nitrocelulosa sobre el césped bacteriano y se dejó absorber durante 2 min; cuando se hicieron varias réplicas, los filtros posteriores se tuvieron 4 min sobre la placa. Se tomaron puntos de referencia en el filtro respecto a la placa. Después, se desnaturalizó el DNA sumergiendo el filtro (invertido respecto a su colocación en la placa) durante 2 min en Solución de Desnaturalización (ver materiales), se pasaron a la Solución de Neutralización durante 2 min y finalmente se lavaron durante 30 s en Tris-Cl 0.2 M pH 8.0, SSC-2X. Los filtros se secaron sobre papel Whatman 3MM y se mantuvieron a 80 °C durante 2 h para adherir el DNA al filtro.

Para eliminar restos de agar, los filtros se lavaron durante 1 h a 42°C, con agitación, en el tampón: 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS.

- Prehibridación de los filtros:

Se incubaron a 42°C durante 2 h en Solución de Prehibridación.

- Hibridación de los filtros:

Se incubaron los filtros a 42°C durante 24 h en Solución de Hibridación, a la que se añadió la sonda correspondiente previamente desnaturalizada a 90°C durante 5 min.

- Lavado de los filtros:

Se lavaron 2 veces durante 15 min. a temperatura ambiente en SSC-2X, SDS-0.1% y luego a 55°C otras 2 veces durante 15 min. en SSC-0.1X, SDS-0.1%. Se dejaron secar sobre papel Whatman 3MM y se colocaron junto a una película de autorradiografía.

Valoración de la calidad y representatividad de transcritos en las genotecas:

El chequeo de las genotecas se realizó midiendo el porcentaje de clones de cDNA de actina existentes en cada una de ellas. Para ello se mezclaron 500 µl de células SURE en MgSO₄ 10 mM con 2x10⁴ pfu de cada genoteca en SM y se incubaron a 37°C durante 15 min. Se añadió 8 ml de top-agar precalentado a 48°C y la mezcla se vertió sobre placas (150 mm) de LB-agar-tetraciclina. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y después a 4°C durante 3 h. Los fagos se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con sondas de β-actina marcadas por "random priming" con α³²P-dCTP. Se contó, en las autorradiografías, el número de halos positivos y se calculó el porcentaje de clones existentes.

Síntesis de sscDNA para el análisis diferencial:

Partiendo de 300µg de RNA total se extrajo poli(A)⁺-RNA por el método ya descrito y se precipitó con acetato sódico 4M y etanol a -20°C (Sambrook y col.,1989). Se resuspendió en 5 µl de H₂O-DEPC y se añadió al tubo 2.5 µg de oligo(dT)₁₅ en 15 µl de H₂O. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 min y el tubo se puso a 4°C donde se

añadieron los siguientes componentes para tener un volumen final de 50 μ l:

- Inhibidor de RNasas (rRNasin): 20 u. (0.5 μ l)
- Tris-Cl 1 M, pH 8.0: 2.5 μ l
- KCl 1 M, pH 8.0: 3.5 μ l
- $MgCl_2$ 250 mM: 2 μ l
- dATP, dGTP, dTTP (3.33 mM): 7.5 μ l
- dCTP (0.05 mM): 10 μ l
- DTT 0.1 M: 2 μ l
- $\alpha^{32}P$ -dCTP: 100 μ Ci (10 μ l)
- AMV-RT: 50 u. (2 μ l)

La mezcla se incubó a 42°C durante 1 h. Se puso después en hielo durante 5 min y se añadió 2 μ l de NaOH 3M. Se incubó a 70°C durante 20 min para destruir el RNA y posteriormente se neutralizó el NaOH con 5 μ l de HCl 1N y se extrajo con 2 volúmenes de fenol/cloroformo. La fase acuosa se pasó a otro tubo y se precipitó con 5 μ g de tRNA, 0.5 vol. de acetato amónico 8M y 2 vol. de etanol a -20°C, toda la noche. Se centrifugó a 10^4 g durante 10 min y el precipitado se resuspendió en 200 μ l de tampón TE. Se calentó a 90°C, 5 min y se añadió a la solución de hibridación.

Mantenimiento de los fagos:

Cada clon del bacteriófago de interés se guardó, recogiendo con una pipeta Pasteur el tapón de agar sobre el que creció, y poniéndolo en un tubo eppendorf que contenía 1 ml de tampón SM y 20 μ l de cloroformo. Se guardaron así a 4°C.

Síntesis de oligonucleótidos:

Se sintetizaron 0.2 μ moles de 2 oligonucleótidos de 20 bases cada uno, correspondientes a las regiones flanqueantes del sitio de clonaje del inserto de cDNA en el vector λ -ZAP. Se denominaron P el situado hacia el extremo 3' del inserto y RP el situado hacia el extremo 5'.

P: 5' TGACCATGATTACGCCAAGC 3'

RP: 5' TGTAACGACGGCCAGTGA 3'

Una vez sintetizados mediante el sistema "Gene Assembler Plus" (Pharmacia) (Gait, 1989) los oligonucleótidos fueron purificados usando columnas de afinidad (Applied Biosystems). El cassette de silicagel sobre el que se hizo la síntesis se pasó a un tubo eppendorf, se centrifugó a 10^4 g. durante 2 min, se añadió 1 ml de NH_4OH (32%) y se volvió a centrifugar como antes. El tubo se incubó así a 50°C durante 20 h. Al cabo de este tiempo se recogió todo el NH_4OH y se pasó a otro eppendorf donde se añadió 1/3 vol. de H_2O desionizada.

El cartucho de purificación se conectó a una jeringa de 10 ml y se lavó con 5 ml de acetonitrilo y después con 5 ml de acetato de trietilamina 2 M. Una vez preparado, se pasó tres veces la muestra que contenía el oligonucleótido (recogiendo el eluido y volviéndolo a pasar). Después se lavó el cartucho con:

- 3 veces con 5 ml de NH_4OH 1.5 M
- 2 veces con 5 ml de H_2O desionizada
- 1 vez con 5 ml de ácido trifluoroacético 2%
- 2 veces con 5 ml de H_2O

Finalmente se eluyó el oligonucleótido con 1 ml de acetonitrilo 20 %, se repartió en varios tubos y se secó a 60°C usando una centrifuga de vacío. En este estado se guardó a -20°C. En el momento de su uso se resuspendió en H₂O y se midió la D.O. a 260 nm para calcular el número de moles obtenidos. También se comprobó el tamaño de los oligonucleótidos en geles de agarosa (4%) en TBE.

Amplificación por PCR de los insertos de cDNA de una genoteca:

En un volumen final de 100 µl se añadió KCl 50 mM, Tris-HCl(pH 8.0) 10 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 25 picomoles de los oligonucleótidos P y RP y 10 µl de la suspensión de fago en SM. La mezcla se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar el DNA y se añadieron 2.5 u. de Taq DNA polimerasa (Promega). Después se repitieron durante 35 ciclos las siguientes condiciones:

- Desnaturalización: 94°C, 1 min.
- Anillamiento: 55°C, 2 min.
- Extensión: 72°C, 2 min.

Finalmente se incubaron a 72°C, 10 min y se guardaron a 4°C para su posterior análisis en geles de agarosa.

Transferencia de DNA a filtros (Southern-Blot):

Se polimerizó un gel horizontal de agarosa al 1% (p/v) en TBE y se cargaron las muestras de DNA, previamente desnaturalizadas a 90°C, 5 min. La electroforesis tuvo lugar a 80 V durante 2 h en TBE y después el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml) para

poder ser fotografiado. El gel se sumergió durante 1 h en solución de desnaturalización, después 1 h en solución de neutralización y al final se lavó con SSC-2X. El DNA se transfirió a membranas de nylon con SSC-20X según protocolos convencionales (Sambrook y col., 1989).

Excisión del pBluescript a partir del vector λ -ZAP:

El vector λ -ZAP (Stratagene) fue diseñado para permitir la excisión *in vivo* y la recircularización de un fragmento en forma de plásmido (pBluescript en este caso), junto con el inserto clonado (Short y col., 1988).

Se recogió el clon de interés de la placa de agar y se transfirió a un eppendorf estéril que contenía 500 μ l de tampón SM y 20 μ l de cloroformo. Se agitó el tubo para liberar el fago y se guardó a 4°C, 2 horas.

En un tubo cónico se mezclaron 200 μ l de células XL1-Blue (D.O.₆₀₀=1.0) previamente crecidas en medio LB-MgSO₄-maltosa y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM, con 200 μ l de la dilución del fago (>10⁵ pfu) y 1 μ l de fago "helper" R408 (> 10⁶ pfu/ml) (Stratagene). Como control negativo se mezcló en otro tubo el fago R408 con las bacterias XL1-Blue sin ningún fago recombinante. Se incubaron los tubos a 37°C, 15 min. Después se añadió 5 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 3h con agitación. Se calentaron los tubos a 70°C durante 20 min y se centrifugaron a 3000 g., 5 min. El sobrenadante, que contenía el pBluescript, se decantó en un tubo estéril y se guardó a 4°C. Para plaquear este fagémido se hicieron las siguientes mezclas:

A- 200 μ l del sobrenadante del fago

200 μ l de XL1-Blue

B- 20 μ l de una dilución 10^{-2} del sobrenadante del fago

200 μ l de XL1-Blue

Se incubaron a 37°C durante 15 min. De cada mezcla se sembraron 25 μ l en placas que contenían LB-Amp-XGal-IPTG y se incubaron a 37°C toda la noche.

Las colonias blancas que aparecían en la placa contenían el plásmido pBluescript con el inserto de cDNA clonado, mientras que las colonias azules no tenían inserto (Bullock y col., 1987). Por otro lado, las bacterias infectadas con el fago R408 sólo, no crecían porque no contenían el gen de resistencia a ampicilina. Para conseguir colonias individuales, se resembraron en placas que contenían LB-Amp y se crecieron en medio líquido LB-Amp que se repartió en alícuotas y se guardó a -80°C con un 50% de glicerol.

Purificación de DNA de plásmidos:

Partiendo de 2 ml de cultivo de bacterias XL1-Blue transformadas, se siguió el método de lisis alcalina en pequeña escala (Birnboim y Doly, 1979). El DNA resultante se resuspendió en H₂O y se guardó a 4°C.

Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa:

Se emplearon una serie de productos y soluciones comercializados por BIO 101 Inc. con el nombre de "Geneclean" que contiene:

- Una solución saturada de NaI.

- Una solución concentrada de NaCl, Tris y EDTA, a partir de la cual se preparó la solución de lavado "New" por adición de agua destilada y etanol absoluto.
- Una suspensión de matriz de sílice en agua, denominada "Glassmilk".

Los geles se polimerizaron usando TAE como tampón de electroforesis. Cuando las bandas de DNA estuvieron bien separadas, se escindió el trozo de gel que contenía la banda de interés, se le añadió el doble de su volumen de NaI y se incubó a 50°C hasta que la agarosa quedó disuelta. A continuación se añadieron 5 µl de "Glassmilk", la mezcla se agitó y se mantuvo en hielo durante 5 min para permitir la unión del DNA a la matriz de sílice. Después se centrifugó durante 20 s a 10^4 g. El sedimento correspondiente al DNA unido a la matriz fue recuperado y resuspendido en 400 µl de solución de lavado "New", tras lo cual volvió a ser centrifugado. Este proceso se repitió tres veces; al final, para eluir el DNA de la matriz de sílice, el sedimento se resuspendió en 20 µl de H₂O y se incubó a 50°C durante 5 min. Tras centrifugar a 10^4 g. durante 2 min, se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA. Las muestras, en este punto, quedaron listas para ser sometidas a reacciones enzimáticas o cualquier otra manipulación.

Secuenciación de DNA:

Se realizó sobre moldes de cadena doble según el método de los terminadores de cadena por desoxinucleótidos (Sanger y col., 1977) y en las condiciones especificadas por el "T7-Sequencing kit" (Pharmacia), usando para ello T7-DNA polimerasa. Como iniciadores se usaron los mismos oligonucleótidos (P, RP) sintetizados para la

amplificación de los insertos de cDNA en pBluescript. Con el RP se secuenció el extremo 5' y con el P el extremo 3'. Se consiguió una lectura nítida de 150-200 bases por cada extremo.

Geles desnaturalizantes de acrilamida-6.5% para productos de secuenciación:

Se polimerizó un gel vertical de poliacrilamida mezclando los siguientes productos:

- TBE-10X: 7 ml
- Solución de Acrilamida 20%: 28 ml
- Solución de Urea 46%: 35 ml

Se filtró con papel Whatman 3MM y se añadió:

- Persulfato amónico 10% (p/v), preparado fresco: 300 μ l
- TEMED: 70 μ l

Se aplicó el peine de secuenciación, se lavaron los pocillos con tampón TBE, se montó el gel en la cubeta con tampón TBE y se conectó a 1000 voltios durante 1 h. Después se desnaturalizaron las muestras a 85°C durante 3 min, se cargaron en el gel y se volvió a conectar a 1000 voltios durante 4 h. El gel se lavó en ácido acético 10% (v/v) y metanol 10% (v/v) y después se secó al vacío a 80°C durante 1h sobre papel Whatman 3MM. Se expuso una película autorradiográfica y al cabo de 24 h se reveló para proceder a la lectura de las secuencias.

Análisis comparativo de secuencias:

Las secuencias de los fragmentos correspondientes a los dos extremos de cada clon de cDNA fueron comparadas con todas las

existentes hasta entonces en el banco de secuencias EMBL, usando para ello el programa FASTA (Pearson, 1990).

Transferencia de RNA a filtros (Northern-Blots):

Se polimerizó un gel horizontal de agarosa al 1% (p/v) en MOPS-1X y formaldehído al 17% (v/v). Se resuspendieron 15 µg de RNA de cada muestra, en 30 µl de una solución que contenía formamida 50%, MOPS-1X y formaldehído 2.1 M. Se tuvieron los tubos a temperatura ambiente durante 30 min, se calentaron a 60°C durante 5 min para desnaturalizar el RNA y se aplicaron las muestras en el gel. La electroforesis tuvo lugar a 25 voltios durante 18 h en MOPS-1X. Al finalizar, se tiñó el gel con bromuro de etidio (10 µg/ml) y acetato amónico 0.1 M. Se tomó una fotografía con una escala de referencia, para después señalar en el filtro el origen de la electroforesis. El RNA se transfirió a membranas de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad), con SSC-20X, según protocolos convencionales, por capilaridad, o mediante transferencia por vacío a 60 mbares durante 2 h (Sambrook y col.,1989).

Hibridación de filtros con sondas marcadas:

Los filtros obtenidos tras Southern o Northern Blot, se trataron con una radiación de ultravioleta a 1200 µjulios durante 1 min para fijar los ácidos nucleicos a las membranas de nylon. Después, se incubaron durante 4 h en solución de prehibridación a 42°C. Se preparó solución de hibridación y se añadió la sonda de DNA marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y desnaturalizada (5 min a 90°C). Los filtros se incubaron a 42°C durante 24 h en esta solución y se lavaron a

temperatura ambiente 2 veces durante 15 min en SSC-2X, SDS 0.1% y luego 2 veces a 55°C durante 15 min en SSC-0.1X, SDS 0.1%. Finalmente se expusieron a una película autorradiográfica. El tamaño molecular se determinó en base a las referencias marcadas en el filtro.

RESULTADOS

RESULTADOS

Acumulación de tejidos y extracción de RNA total:

Se prepararon hembras de ratón Swiss gestantes y se extrajeron embriones correspondientes a los días 13 al 19 p.c. De cada uno de los días de gestación se acumularon aproximadamente 600 ovarios y se recogieron también muestras de hígado, músculo, riñón, intestino, cerebro y corazón. A partir de 300 ovarios fetales de cada uno de los días se obtuvo una media de 300 µg de RNA total. Del resto de los tejidos también se extrajo RNA total y el rendimiento fue dependiente del tipo de tejido.

Mediante preparaciones citológicas se examinó el estadio meiótico de los oocitos en los diferentes días y se comprobó que la mayoría estaban en estadio de paquitena en el día 16 p.c. (Fig. 6). Lo mismo se hizo con los espermatoцитos procedentes de ratón adulto y de humano y en ambos casos se observó la presencia de todos los tipos celulares meióticos y somáticos, que componen el túbulo seminífero (Fig. 6).

En la figura 5 se observa la morfología externa, el tamaño y el cambio producido en el transcurso del día 13 al 16 del ovario y testículo fetales de ratón.

Construcción de las genotecas de cDNA en λ -ZAP:

Se construyeron genotecas de cDNA a partir de RNA de testículo de ratón adulto, de ovario fetal de 16 d y de 17 d. En los tres casos el proceso seguido fue el mismo.

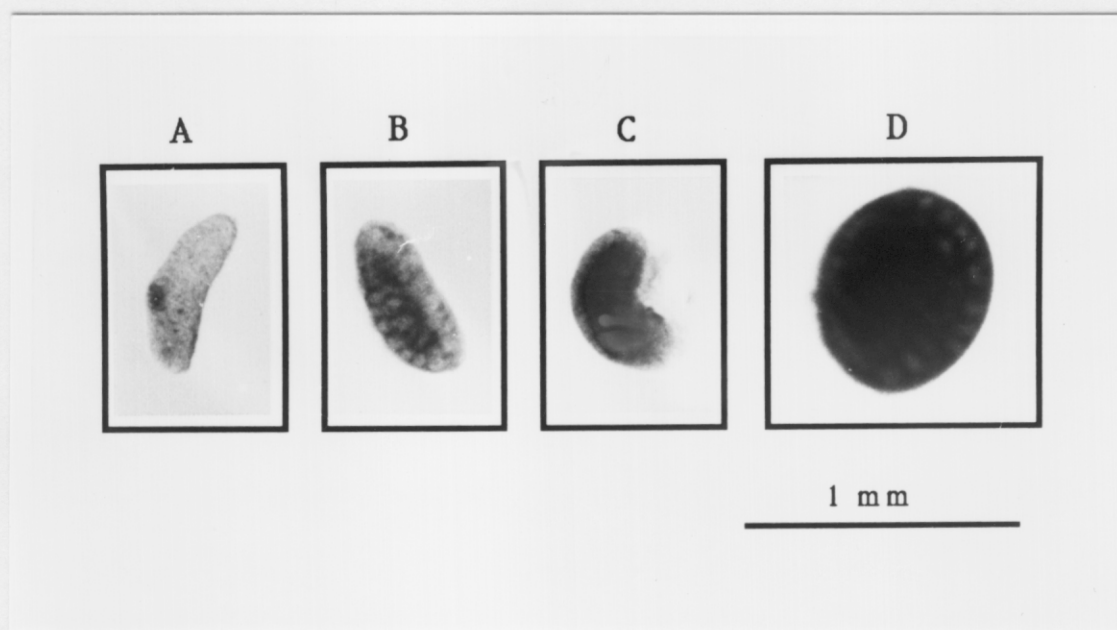


Figura 5: A: ovario fetal de 13 d; B: testículo fetal de 13 d; C: ovario fetal de 16 d; D: testículo fetal de 16 d.

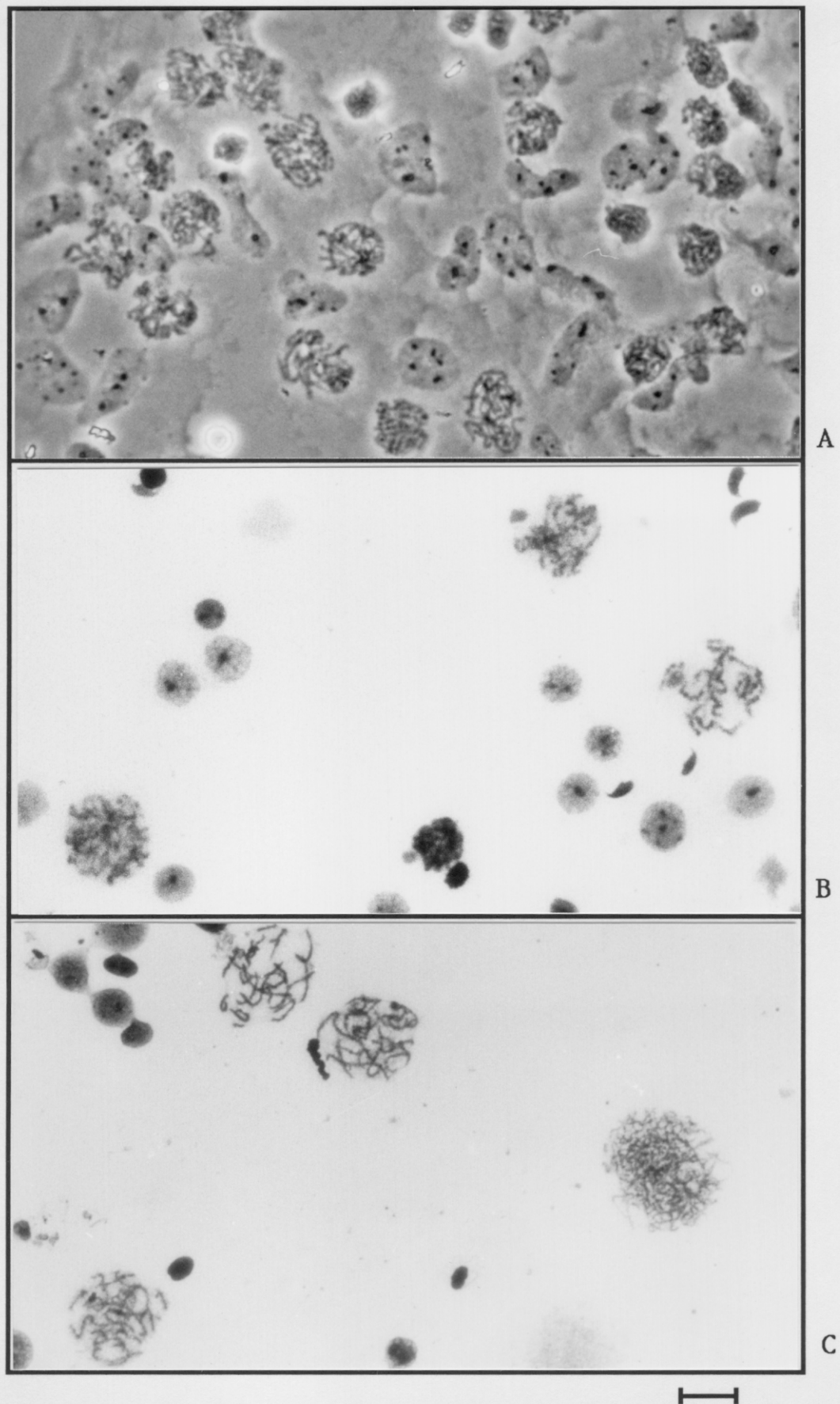


Figura 6: A: tipos celulares presentes en ovarios fetales de 16 d (meiocitos en paquitena); B: algunos tipos celulares de testículo de ratón adulto; C: algunos tipos celulares de testículo humano. El segmento corresponde a 15 μm .

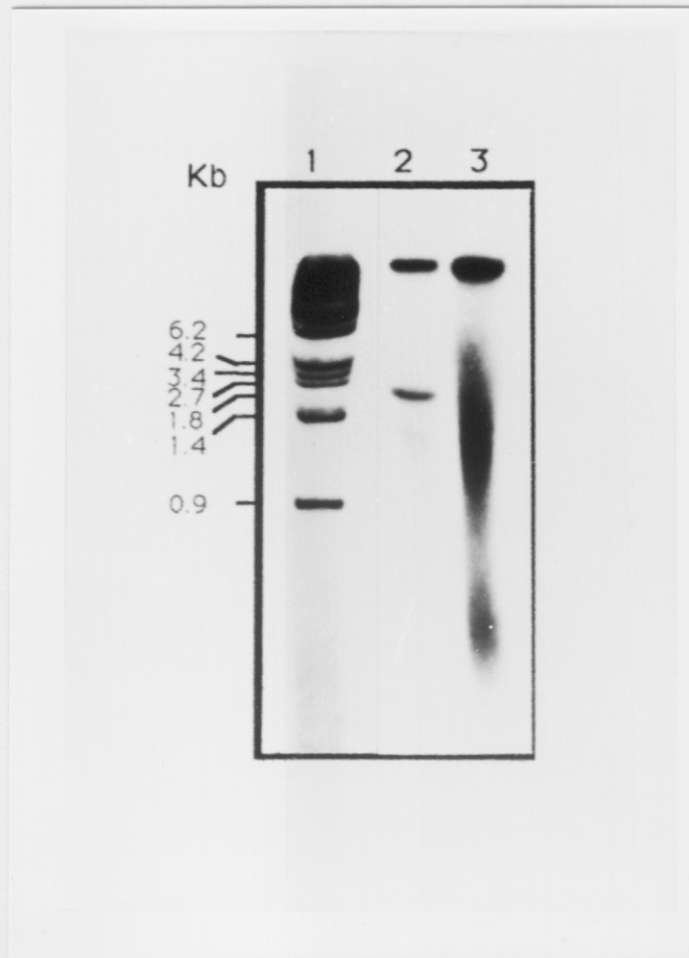


Figura 7: Gel de acrilamida al 3.5% de una alícuota tras la síntesis de la segunda cadena de cDNA, para la construcción de las genotecas en λ -ZAP. Carril 1: DNA de λ cortado con StyI y marcado por el fragmento Klenow de la DNA pol I, con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Carril 2: cDNA control sintetizado a partir de un mRNA de 1800 b. Carril 3: cDNA sintetizado a partir de poli(A)⁺-RNA de ovario fetal (16d p.c.).

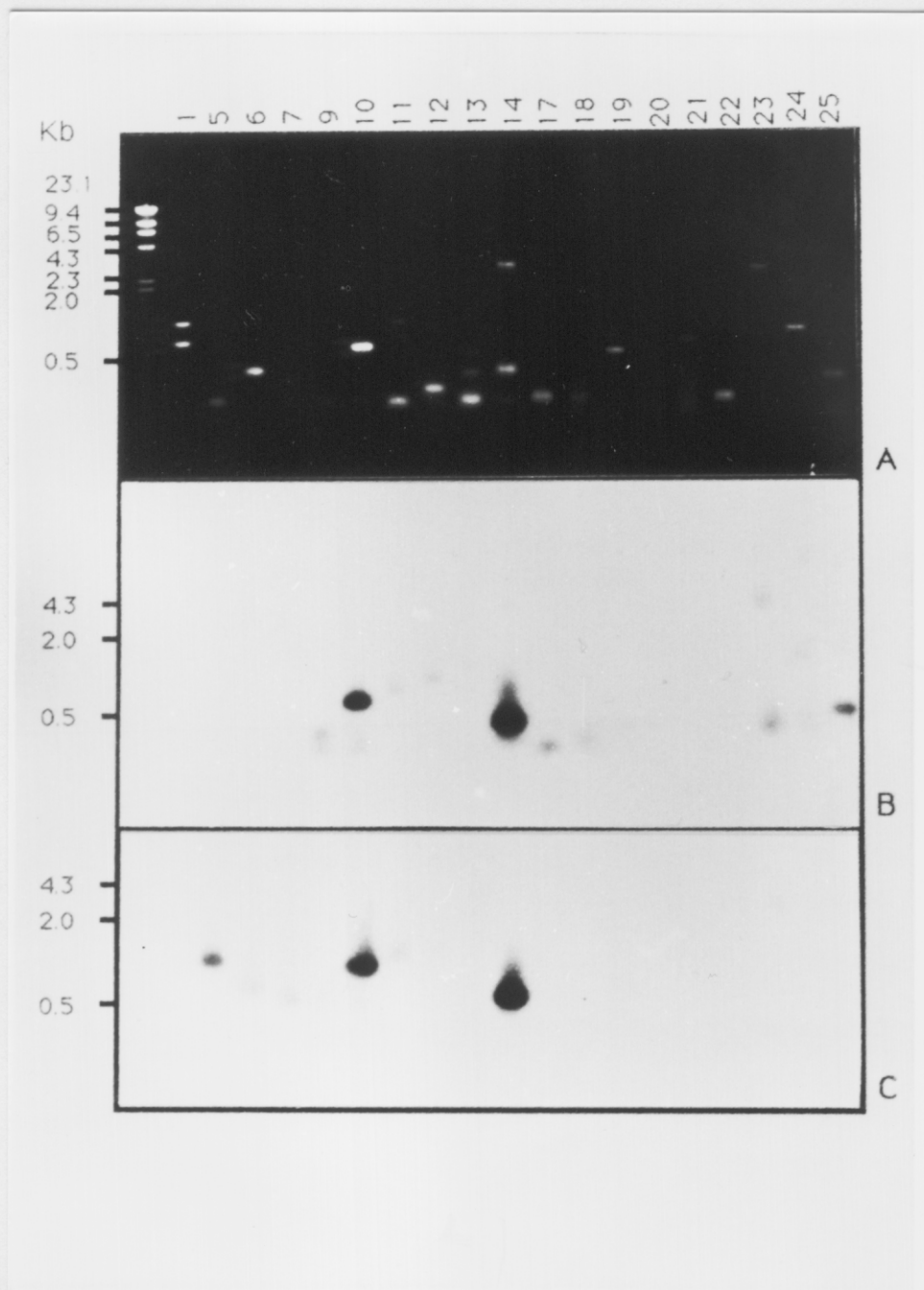


Figura 8: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 1 al 25. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

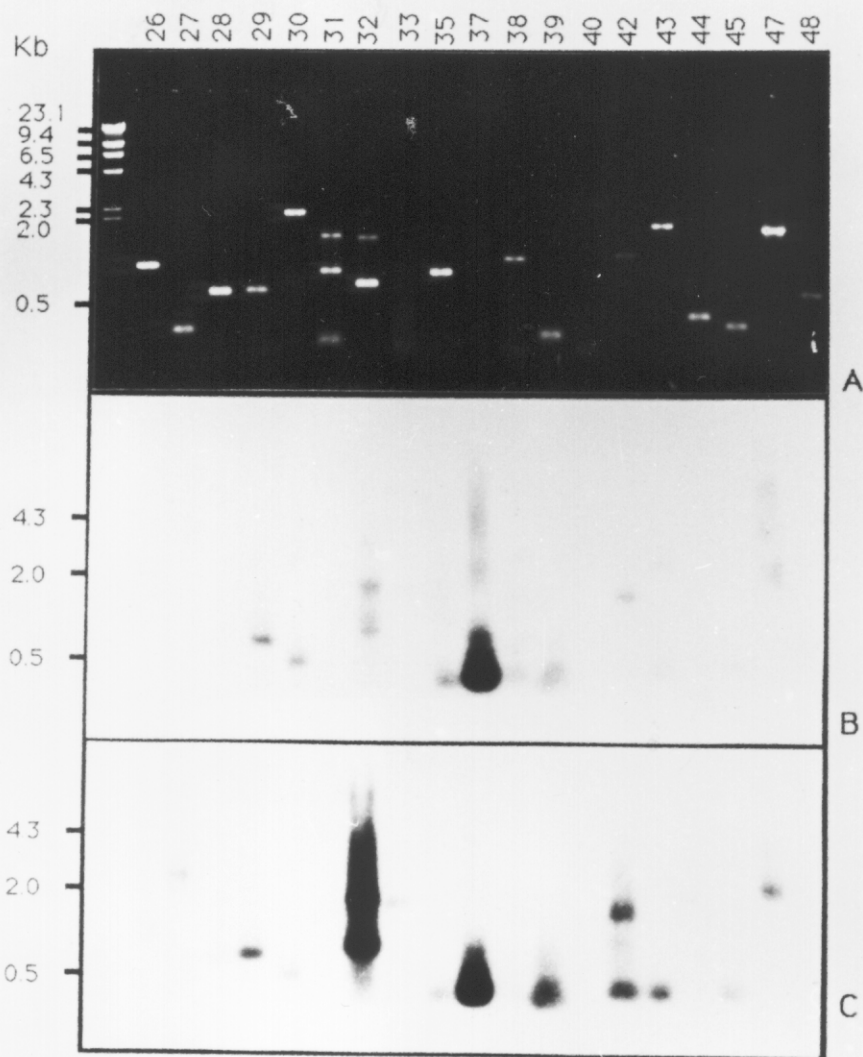


Figura 9: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 26 al 48. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

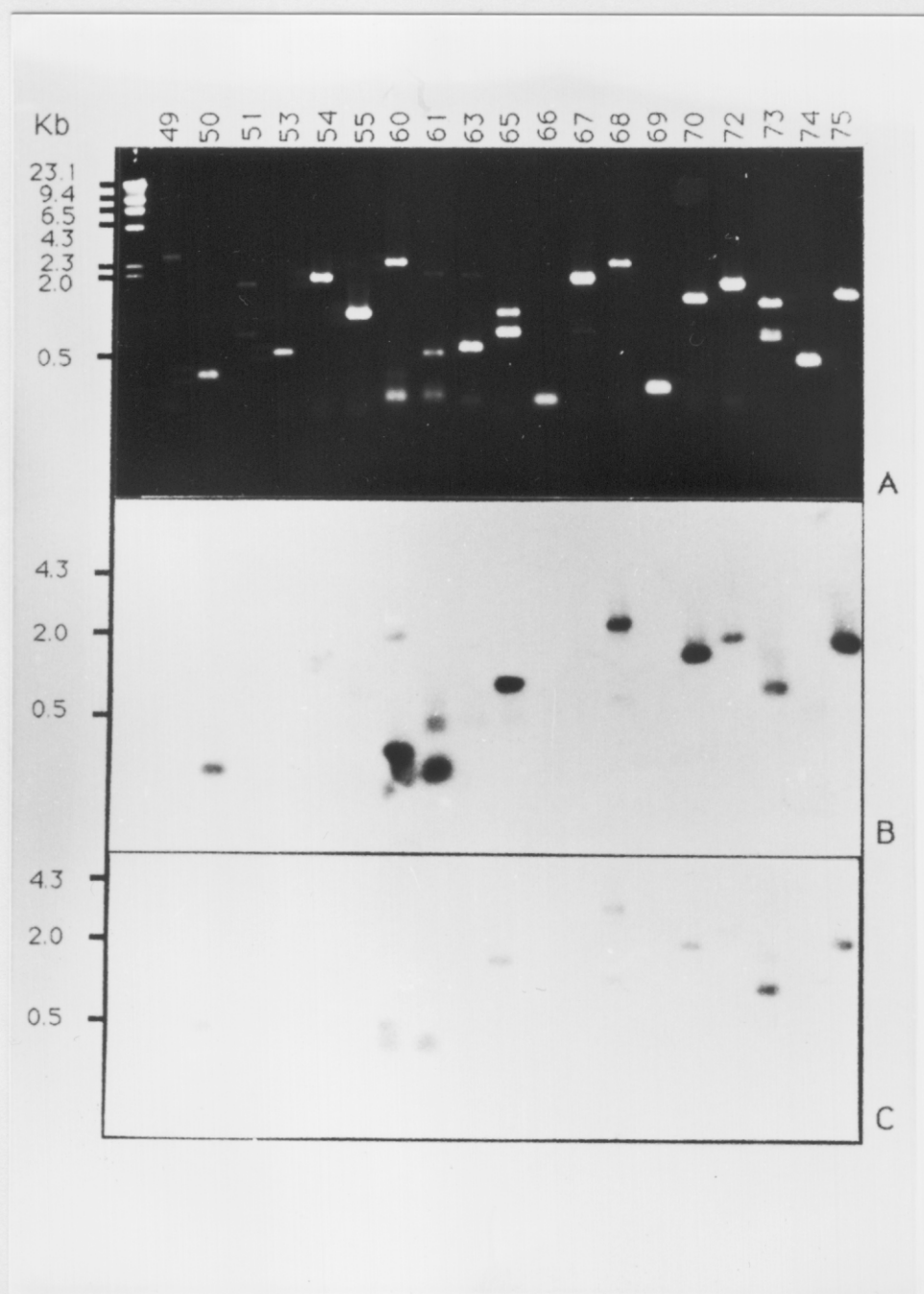


Figura 10: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 49 al 75. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

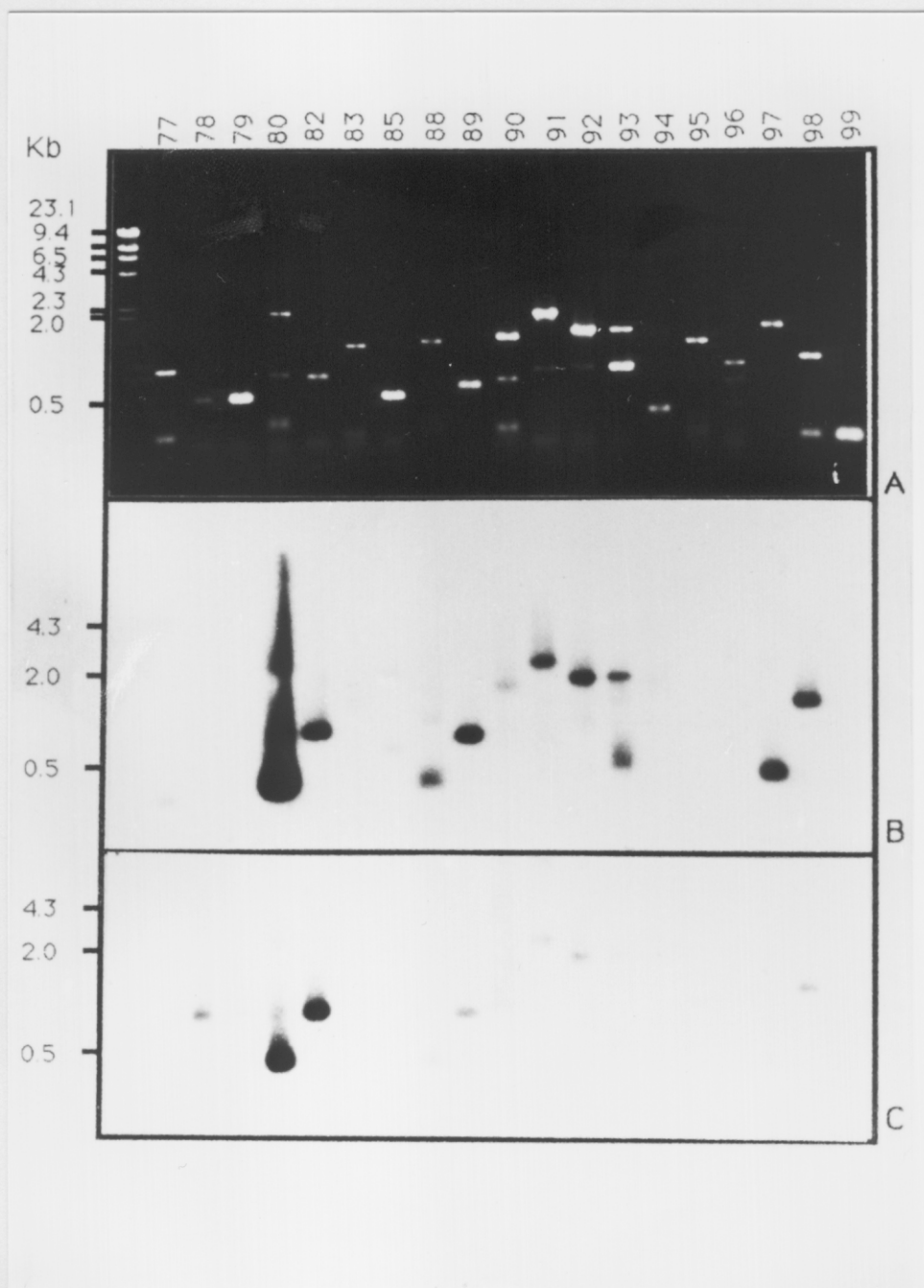


Figura 11: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 77 al 99. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

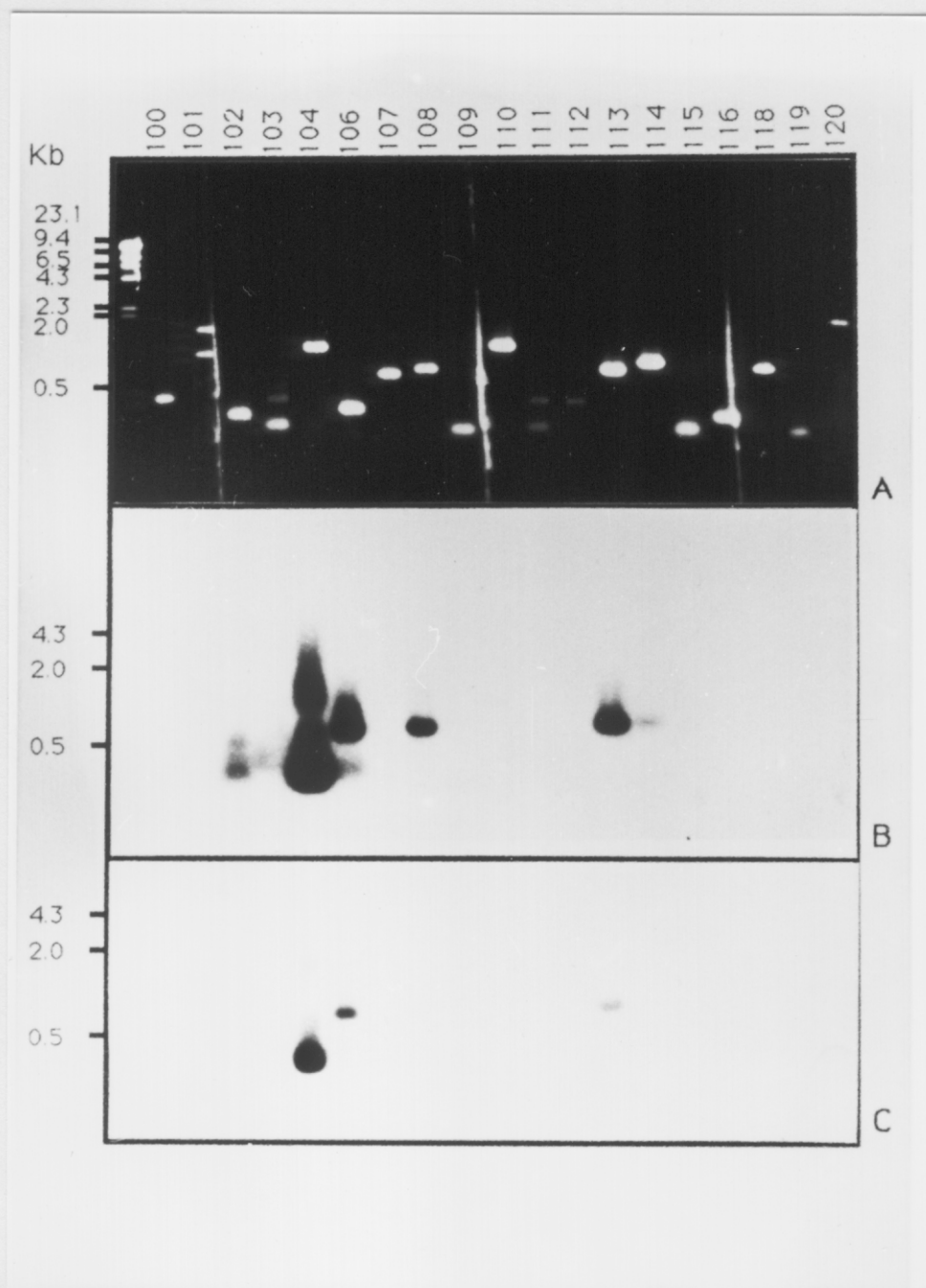


Figura 12: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 100 al 120. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

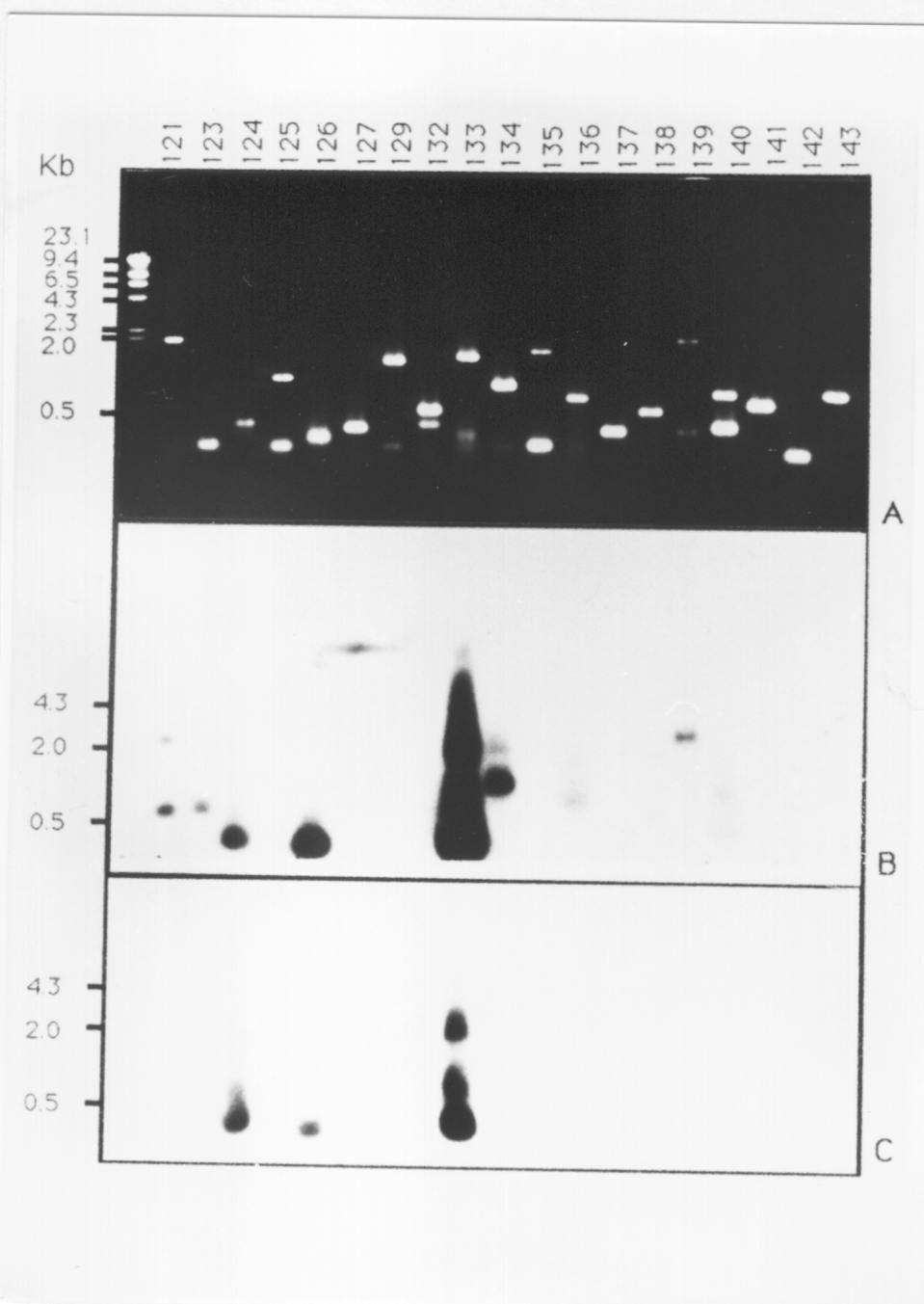


Figura 13: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 121 al 143. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

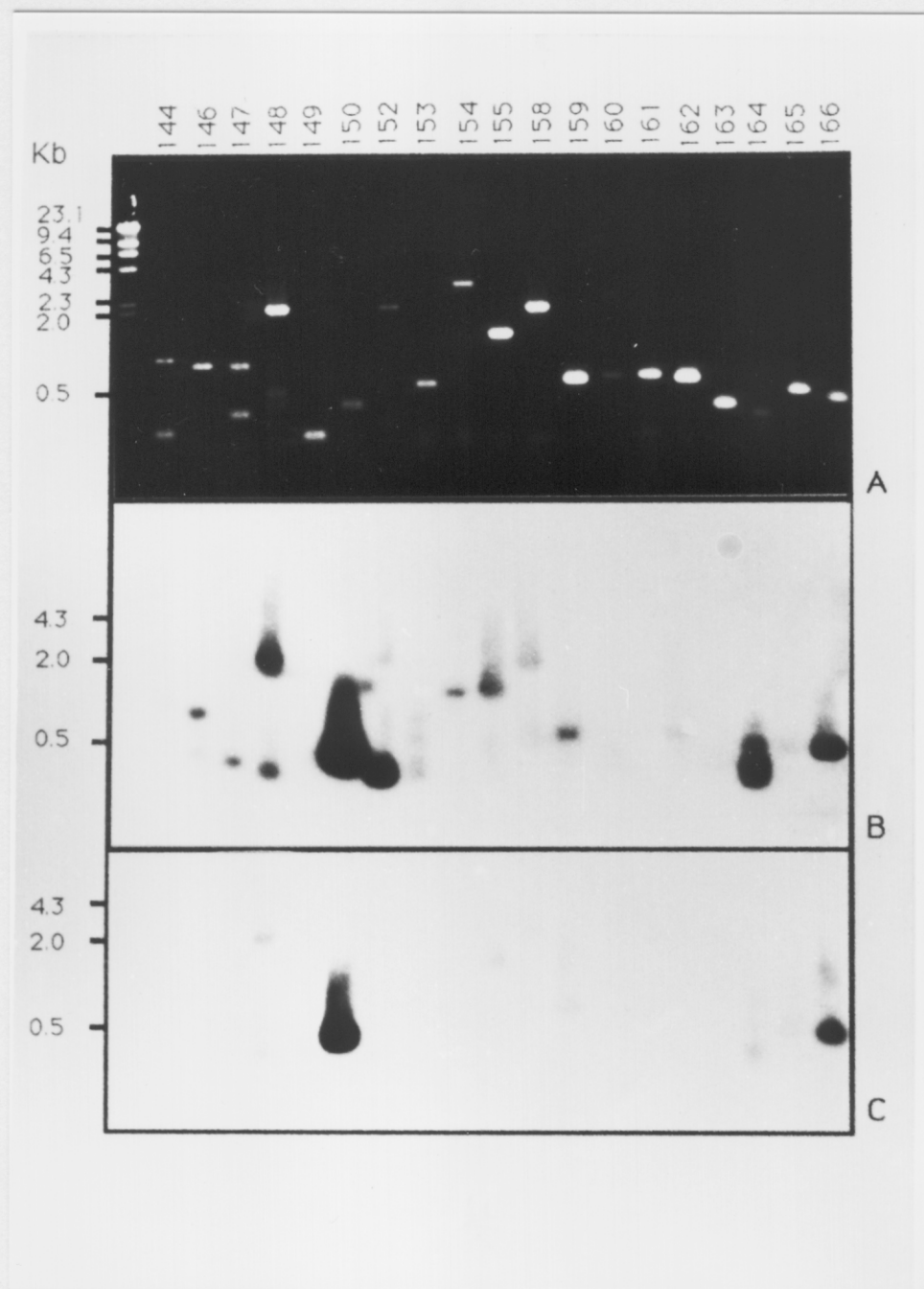


Figura 14: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 144 al 166. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

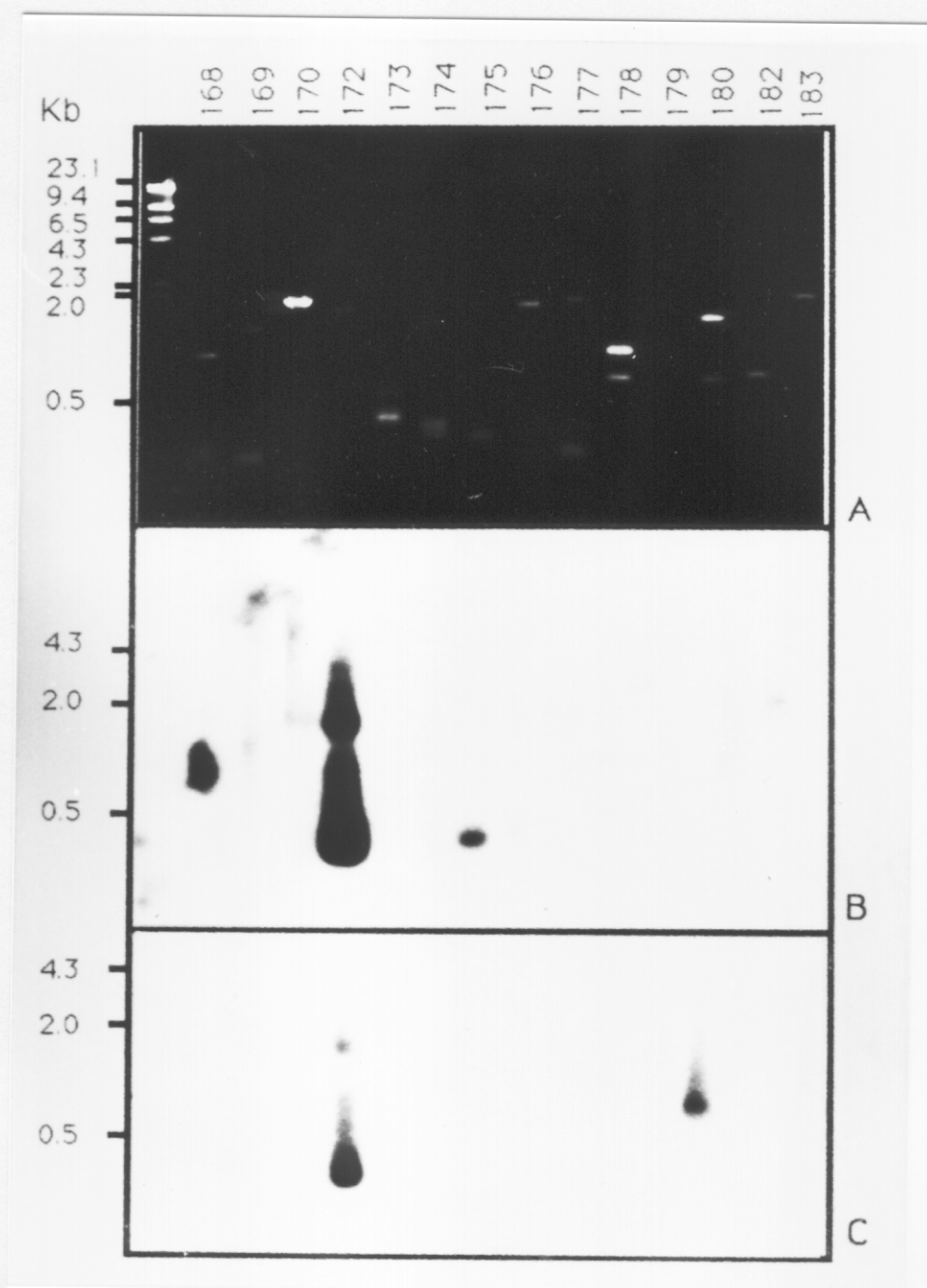


Figura 15: Southern blot del producto de amplificación, por PCR, de los cDNAs correspondientes a los clones 168 al 183. A: Gel de agarosa-1%-TBE del producto de la amplificación. B: Hibridación con la sonda de sscDNA marcada, procedente de testículo adulto. C: Hibridación con la sonda de sscDNA procedente de una mezcla de tejidos somáticos de 16 d p.c.

ABRIR RESULTADOS - Análisis diferencial...

